

PCT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
 United States Patent and Trademark
 Office
 Box PCT
 Washington, D.C. 20231
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 25 August 2000 (25.08.00)	Applicant's or agent's file reference 992935woMegn
International application No. PCT/EP99/10142	Priority date (day/month/year) 21 December 1998 (21.12.98)
International filing date (day/month/year) 21 December 1999 (21.12.99)	
Applicant MÜLLER, Jürgen, Rolf	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

20 July 2000 (20.07.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:2. The election ☒ was☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer A. Karkachi Telephone No.: (41-22) 338.83.38
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------

**INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)**

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : G02B 21/00		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/37984
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:	29. Juni 2000 (29.06.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/10142		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 21. Dezember 1999 (21.12.99)			
(30) Prioritätsdaten:		Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
60/113,478 ✓ 21. Dezember 1998 (21.12.98) US 98124314.0 ✓ 21. Dezember 1998 (21.12.98) EP 198 60 549.8 ✓ 21. Dezember 1998 (21.12.98) DE			
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): EVOTEC BIOSYSTEMS AG [DE/DE]; Schnackenburgallee 14, D-22525 Hamburg (DE).			
(72) Erfinder; und			
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MÜLLER, Jürgen, Rolf [DE/DE]; Glückstrasse 4a, D-22081 Hamburg (DE).			
(74) Anwälte: MEYERS, Hans-Wilhelm usw.; Von Kreisler Selting Werner, Postfach 10 22 41, D-50462 Köln (DE).			

(54) Title: SCANNING MICROSCOPIC METHOD HAVING HIGH AXIAL RESOLUTION

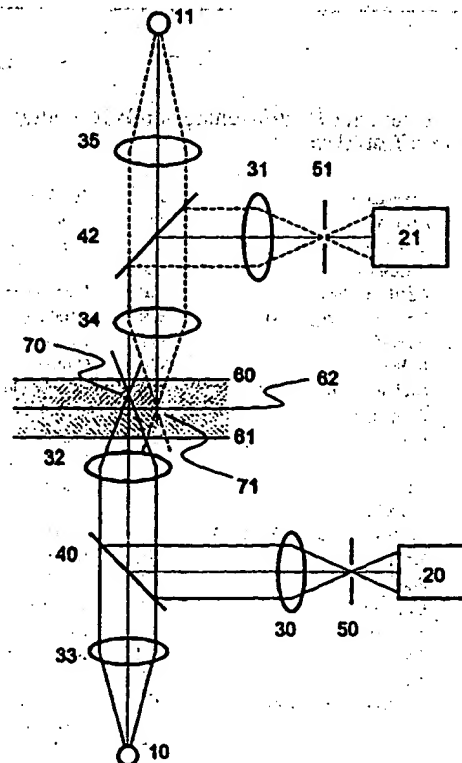
(54) Bezeichnung: SCANNING-MIKROSKOPISCHES VERFAHREN MIT HOHER AXIALER AUFLÖSUNG

(57) Abstract

The invention relates to a method for optically detecting at least one entity arranged on a substrate (60). The at least one entity is scanned with a measuring volume (70) using at least one radiation source (10) and at least one set of confocal optics (32) or using a set of optics (32) configured for multi-photon excitation. An auxiliary focus (71) is generated before and/or during the scanning process while using at least one radiation source (11) and at least one set of optics (34). Said auxiliary focus lies at least partially on the contact surface (62) between the substrate (60) and the adjacent component or on another contact surface (62) located in a defined spatial relationship with regard to the entity. A retroreflection from the auxiliary focus (71) is detected in a confocal manner by at least one detector (21), is used for measuring the position of the contact surface (62) and is thus used for indirectly positioning the measuring volume (70). According to the inventive method, the position of the auxiliary focus (71) in relation to the measuring volume (70) can be adjusted in a defined manner.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur optischen Erfassung mindestens einer Entität, die auf einem Substrat (60) angeordnet ist. Die mindestens eine Entität wird mit einem Messvolumen (70) unter Verwendung mindestens einer Strahlungsquelle (10) und einer konfokalen Optik (32) oder einer für die Mehrphotonenanregung ausgelegten Optik (32) gescannt. Vor und/oder während des Scanvorganges wird ein Hilfsfokus (71) unter Verwendung mindestens einer Strahlungsquelle (11) und einer Optik (34) erzeugt, der zumindest teilweise auf der Grenzfläche (62) zwischen Substrat (60) und angrenzender Komponente oder einer sonstigen in definierter räumlicher Beziehung zur Entität stehenden Grenzfläche (62) liegt. Ein Rückreflex aus dem Hilfsfokus (71) wird von mindestens einem Detektor (21) konfokal erfasst und zur Messung der Lage der Grenzfläche (62) und somit zur mittelbaren Positionierung des Messvolumens (70) genutzt. In dem erfindungsgemäßen Verfahren ist die Position des Hilfsfokus (71) relativ zum Messvolumen (70) definiert einstellbar.



Die Position des Hilfsfokus (71) relativ zum Messvolumen (70) definiert einstellbar.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Scanning-mikroskopisches Verfahren mit hoher axialer Auflösung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur optischen Erfassung mindestens einer Entität auf bzw. in einem, bevorzugt auf einem Träger befindlichen, Substrat. Ferner werden Anwendungsfelder des erfindungsgemäßen Verfahrens sowie eine Vorrichtung zur Durchführung desselben beschrieben.

Es ist bekannt, daß konfokale oder für Mehrphotonenanregung ausgelegte Anordnungen wegen ihrer hohen axialen Ortsauflösung geeignet sind, um Hintergrundsignale zu reduzieren, welche außerhalb der Fokalebene entstehen. Bei der Erfassung insbesondere großflächiger Strukturen ergibt sich somit das Problem, daß im Rahmen des Scanvorgangs darauf geachtet werden muß, daß die Fokalebene sich zu jeder Zeit an einer gewünschten Position innerhalb des zu untersuchenden Objektes befindet. So kann es vorkommen, daß z. B. Unebenheiten eines Probenträgers, auf dem das zu untersuchende Objekt angeordnet ist, dazu führen, daß sich das konfokale Meßvolumen nicht in der gewünschten Ebene im Objekt befindet, sondern womöglich an das Objekt angrenzende Strukturen, wie z. B. Teile des Probenträgers, erfaßt. Dies wirkt sich nachteilig auf die durchzuführende Objekterfassung und -charakterisierung aus. Es ist daher gewünscht, Maßnahmen zu ergreifen, um die Fokalebene innerhalb einer bestimmten Position zu halten bzw. nachzuführen.

In „Patent Abstracts of Japan“ (vol. 018, no. 436 (P-1786), 15. August 1994) wird eine Vorrichtung zur Detektion der Fokusposition beschrieben, welche zur automatischen Fokussierung einer bilderzeugenden Vorrichtung oder zur Messung von Unebenheiten auf der Oberfläche eines Untersuchungsobjektes geeignet ist. Es wird eine optische Faser verwendet, deren Ende mittels eines Aktuators entlang der optischen Achse bewegt wird. Das derart erzeugte Störsignal wird zur Abweichungserfassung der Fokusposition sowie Nachregelung derselben verwendet.

In „Patent Abstracts of Japan“ (vol. 098, no. 004, 31. März 1998) wird ein Fokusdetektor unter Verwendung des Prinzips der konfokalen Mikroskopie vorgeschlagen.

Die US-Patentschrift 5,062,715 offenbart die Verwendung eines konfokalen Autofokussystems in einem für die Vermessung von Oberflächen-schwingungen ausgelegten Michelson-Interferometer.

Die US-Patentschrift 5,084,612 beschreibt ein bildgebendes Verfahren für ein in Transmissionsgeometrie konstruiertes Scanningmikroskop. Hierbei wird die Lage einer für die Detektion verwendeten Lochblende so nachgeführt, daß etwaige aufgrund von Brechungseffekten im Bereich der Probe auftretende Ablenkungen des transmittierten Lichtes ausgeglichen werden. Es ist jedoch nicht Ziel des Verfahrens, die Lage des Meßfokus in der Probe nachzuführen.

In der internationalen Patentanmeldung PCT/US 95/01886 (internationale Veröffentlichungsnummer WO 95/22058) wird eine konfokale Detektionsvorrichtung beschrieben, welche eine automatische Fokussiereinrichtung aufweist, die eine konfokale Lochblende beinhaltet. Die Autofokussierung wird in drei Schritten vorgenommen. Zunächst wird ein Laser auf die Rückseite eines die Probe beherbergenden Substrates fokussiert. In einem weiteren Schritt wird der Fokus in einer Ebene oberhalb des Substrates positioniert. Erst in einem dritten Schritt wird nach Durchfahren der gewünschten Position auf der Substratoberfläche die genaue Lage der Oberfläche ermittelt und der Fokus auf die Substratoberfläche eingestellt. Dieser Prozeß wird an den vier Ecken des Substrates durchgeführt und gestaltet sich als äußerst zeitaufwendig. Während der eigentlichen Vermessung der Probe ist der Betrieb der Autofokussierung nicht möglich und die Fokushöhe wird durch Interpolation geschätzt. Hierbei können nicht akzeptable Positionierfehler auftreten, insbesondere bei nicht planen Substraten, wie sie aus Kostengründen im Labor in der Regel verwendet werden.

Der Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren bereitzustellen, welches eine zuverlässige Erfassung flächiger Strukturen oder dreidimensionaler Strukturen, welche bevorzugt auf einem flächigen Träger angeordnet sind, in einer Detektionsvorrichtung mit hoher axialer Auflösung, insbesondere einem konfokalen Mikroskop, erlaubt. Ferner soll eine Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens bereitgestellt werden.

Die Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren mit den Merkmalen des Anspruchs 1 sowie eine Vorrichtung mit den Merkmalen der Ansprüche 16 oder 17.

Die Erfindung stellt ein Verfahren und eine Vorrichtung zur optischen Erfassung mindestens einer Entität auf und/oder in einem, bevorzugt auf einem Träger befindlichen Substrat bereit, wobei mittels mindestens einer konfokalen oder für die Mehrphotonenanregung ausgelegten Einrichtung, bestehend aus Strahlungsquelle und einer Optik (wie z. B. einem Objektiv), ein repräsentativer Bereich des die Entität aufweisenden Substrates mit einem Meßvolumen gescannt wird unter Erhalt von Meßwerten optischer Parameter. Diese Meßwerte werden sodann zur Charakterisierung der mindestens einen Entität mittels Signalverarbeitung bearbeitet. Während der Dauer der Aufnahme der Meßwerte behält die mindestens eine Entität ihre Position hinsichtlich des Substrates und/oder des Trägers im wesentlichen bei. Das Substrat weist einen Brechungsindex auf, der verschieden ist von dem mindestens einer an das Substrat angrenzenden Komponente. Bei der angrenzenden Komponente kann es sich beispielsweise um einen Träger handeln, auf dem das Substrat angeordnet ist. Das Substrat kann jedoch auch unmittelbar an eine Immersionsflüssigkeit, Luft oder eine das Substrat abdeckende Komponente, wie z. B. ein Deckglas, angrenzen.

Erfindungsgemäß wird nunmehr vor und/oder während des Scanvorganges ein Hilfsfokus erzeugt, der zumindest teilweise auf der Grenzfläche zwischen Substrat und angrenzender Komponente oder einer anderen geeigneten Grenzfläche liegt. Diese Grenzfläche steht in einer definierten

räumlichen Beziehung zur Entität. So könnte beispielhaft die Entität (z. B. zu untersuchende Makromoleküle wie Proteine oder Nukleinsäuren) in einem Substrat (z. B. einem Gel) eingebettet sein, welches sich auf einem Träger (z. B. Probenträger aus optischem Glas) befindet. Die Funktion des Hilfsfokus besteht darin, die Lage der Grenzfläche zu bestimmen und insbesondere eine Abstandsermittlung zwischen der Grenzfläche und der den Hilfsfokus erzeugenden Optik zu ermöglichen. Erfindungsgemäß stehen Hilfsfokus und Meßvolumen zueinander in einer definierten Lagebeziehung, welche durch den Anwender einstellbar ist. Somit ist es möglich, über die Nachführung der Lage des Hilfsfokus auch die Lage des Meßvolumens relativ zur Grenzfläche nachzuführen. Der Abstand des Meßvolumens von der Grenzfläche kann somit vom Anwender gewählt werden.

Mittels eines Detektors, der konfokal angeordnet ist, wird die Intensität des von der Grenzfläche rückreflektierten Lichtes erfaßt. Diese weist einen Maximalwert auf, sofern der Hilfsfokus in Richtung der optischen Achse auf der Grenzfläche positioniert ist. Die Intensität des Rückreflexes fällt ab, wenn der Hilfsfokus auf der optischen Achse in Richtung des Substrates bzw. der an das Substrat angrenzenden Komponente bewegt wird. Wahlweise können auch mehrere Detektoren entlang der optischen Achse der den Hilfsfokus erzeugenden Optik vor und/oder hinter der Bildebene angeordnet werden und das Verhältnis der detektierten Intensitäten bestimmt werden.

Die Erfindung zeichnet sich somit dadurch aus, daß die Nachführung vorzugsweise on-line während eines gesamten Meßvorganges vorgenommen und dabei das Meßvolumen stets in einer wohldefinierten Ebene mit wählbarem Abstand von der Grenzfläche geführt werden kann. Die Empfindlichkeit der Fokussiervorrichtung gegenüber Abweichungen von der Sollposition ist bevorzugt größer als die entsprechende Empfindlichkeit der konfokalen Meßvorrichtung, wie nachstehend näher erörtert wird.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird der Hilfsfokus mittels derselben Optik erzeugt, die auch zur Erzeugung des Meßvolumens dient. Es ist

sogar möglich, dieselbe Strahlungsquelle zur Generierung von Hilfs- und Meßfokus zu verwenden. Eine derartige Strahlungsquelle emittiert beispielsweise Licht unterschiedlicher Wellenlängen oder Polarisationen, das durch geeignete optische Komponenten separiert und somit den entsprechenden Strahlengängen zugeführt werden kann.

Um die gewünschte Positionierung des Hilfsfokus, und somit mittelbar auch des Meßvolumens, vor und/oder während des Scanvorganges zu ermöglichen, ist es wünschenswert, festzustellen, ob die Position des Hilfsfokus von der Grenzfläche in Richtung des Substrates oder aber in Richtung der an das Substrat angrenzenden Komponente abweicht. Erfindungsgemäß werden folgende Lösungen vorgeschlagen.

In einer ersten bevorzugten Ausführungsform wird die Position des Hilfsfokus relativ zur Grenzfläche im wesentlichen entlang der optischen Achse variiert und die Intensität des Rückreflexes in Abhängigkeit von der Bewegung registriert (siehe Figuren 1, 2, 3, 5 und 6). Hierbei kann beispielsweise die fokussierende Optik entlang der optischen Achse auf- und abbewegt werden. Es ist jedoch auch möglich, das Substrat, welches sich beispielsweise auf einem in z-Richtung unmittelbar oder mittelbar positionierbaren Träger befindet, entsprechend zu bewegen. Es ist ferner möglich, die Divergenz des Strahlenbündels zu variieren, das zur Erzeugung des Hilfsfokus dient. Die Bewegung kann bevorzugt periodisch durchgeführt werden. Die vom konfokal angeordneten Detektor erfaßte Intensität wird sich jeweils dann erhöhen, wenn der Abstand zwischen reflektierender Grenzfläche und Hilfsfokus sich verringert. Umgekehrt wird sich die Intensität erniedrigen, wenn durch die Bewegung der genannte Abstand vergrößert wird. Aus der Bewegungsrichtung, die zu einer Erhöhung bzw. Erniedrigung der detektierten Intensität führt, kann somit ermittelt werden, in welcher Richtung die Position des Hilfsfokus von der Lage der Grenzfläche abweicht und die Abweichung entsprechend korrigiert werden.

Die Amplitude der Bewegung ist bevorzugt so zu wählen, daß eine gleichzeitige Aufnahme von Meßwerten aus dem Meßvolumen nicht gestört

wird. In der Regel wird daher die Amplitude der Bewegung der Größenordnung der axialen Ausdehnung des Meßvolumens entsprechen oder kleiner sein als diese Ausdehnung. Im letzteren Fall sollte die Ausdehnung des konfokal detektierten Volumens des Hilfsfokus - insbesondere in Richtung der jeweiligen optischen Achsen der zur Erzeugung von Hilfsfokus und Meßvolumen verwendeten Objektive - geringer sein als die Ausdehnung des Meßvolumens. Eine solch geringere Ausdehnung kann vorzugsweise dadurch erhalten werden, daß der Hilfsfokus mittels einer Optik mit einer Numerischen Apertur erzeugt wird, die größer ist als die Numerische Apertur der zur Erzeugung des Meßvolumens verwendeten Optik. Wahlweise kann zur Erzeugung des Meßvolumens auch nur ein geringerer Teil der Numerischen Apertur einer gemeinsamen Optik oder der jeweiligen Optiken genutzt werden als zur Erzeugung des Hilfsfokus. In einer weiteren Variante wird bei der Detektion des Hilfsfokus eine konfokal angeordnete Blende verwendet, die eine geringere Öffnung aufweist als eine bei der Detektion des Meßvolumens verwendete konfokal angeordnete Blende.

In einer zweiten bevorzugten Ausführungsform wird die Position des Hilfsfokus relativ zur Grenzfläche sowohl lateral zur optischen Achse der den Hilfsfokus erzeugenden Optik als auch axial bewegt. Die Auswertung des Rückreflexes kann in analoger Weise wie in der vorgenannten Ausführungsform erfolgen.

In einer dritten bevorzugten Ausführungsform wird die Intensität des Rückreflexes mittels mindestens zweier entlang der optischen Achse angeordneter Detektoren erfaßt. Dazu wird das von der Grenzfläche reflektierte Licht des Hilfsfokus beispielsweise über teildurchlässige Spiegel auf die Detektoren aufgeteilt. Die Detektoren werden bevorzugt in unterschiedlicher Entfernung von der fokussierenden Optik, insbesondere vor und hinter der Bildebene, angeordnet, so daß - abhängig von der Lage des Hilfsfokus relativ zur reflektierenden Grenzfläche - unterschiedliche Anteile der reflektierten Intensität von den Detektoren erfaßt werden. Aus der Verteilung der von den Detektoren erfaßten Intensitäten kann somit er-

mittelt werden, in welcher Richtung die Position des Hilfsfokus von der Lage der Grenzfläche abweicht. Dies wird exemplarisch in Fig. 4 dargestellt.

Beispielsweise erfassen zwei in gleichem Abstand von der Bildebene vor und hinter dieser Ebene angeordnete Detektoren ein Intensitätsverhältnis von 1:1, wenn der Hilfsfokus auf der Grenzfläche liegt. Je nach Richtung der Abweichung des Hilfsfokus von der Grenzfläche steigt die Intensität auf einem der Detektoren an.

Eine allfällig ermittelte Abweichung des Hilfsfokus von der gewünschten Position läßt sich in allen Ausführungsformen durch eine entsprechende Nachführung, die ggf. der oben beschriebenen Bewegung überlagert wird, korrigieren. Es ist bevorzugt, den Hilfsfokus so nachzuführen, daß dieser sich im wesentlichen auf der Grenzfläche befindet.

Um einen möglichst geringen apparativen Aufwand zu betreiben, ist es wünschenswert, den Hilfsfokus mittels derselben Optik zu erzeugen, die auch zur Erzeugung des Meßvolumens dient. In einer derartigen Ausführung der Erfindung können beispielsweise teildurchlässige Spiegel eingesetzt werden, um die Strahlen, die Meßvolumen bzw. Hilfsfokus erzeugen, vor dem Objektiv zusammenzuführen, sowie die aus dem Meßvolumen bzw. Hilfsfokus detektierte Strahlung wieder zu separieren. Möchte man beispielsweise Meßvolumen und Hilfsfokus in einstellbarem Abstand zueinander im wesentlichen entlang der optischen Achse anordnen, so ist es zweckmäßig, dem Objektiv auf der der Probe abgewandten Seite geeignete optische Elemente (z. B. Linsen, konvexe oder konkave Spiegel) mit dem Ziel vorzuschalten, zwei Strahlenbündel unterschiedlicher Divergenz bzw. Konvergenz zu erzeugen, die sodann vom Objektiv zum Meßvolumen einerseits und Hilfsfokus andererseits fokussiert werden.

Andererseits kann eine Anordnung gewählt werden, in der Meßvolumen und Hilfsfokus über separate Optiken erzeugt werden. In diesem Fall werden die beiden Optiken vorteilhaft mechanisch oder regelungstechnisch

so verbunden, daß eine Nachführung des Hilfsfokus eine entsprechende Nachführung des Meßvolumens bewirkt. Auch in dieser Ausführung können Meßvolumen und Hilfsfokus entweder ganz oder teilweise überlappend, oder aber räumlich getrennt angeordnet sein. Die Positionierung von Hilfsfokus und Meßvolumen zueinander kann in diesem Fall durch die Positionen der beiden genannten Optiken zueinander eingestellt werden.

Es kann bevorzugt sein, den Anregungsstrahlengang sowohl für das Meßvolumen als auch für den Hilfsfokus mit ein- und derselben Strahlungsquelle zu erzeugen, die optional in der Lage ist, Strahlung unterschiedlicher Wellenlängen zu emittieren. Andererseits kann es, insbesondere bei räumlicher Trennung von Meßvolumen und Hilfsfokus, bevorzugt sein, zwei getrennte Strahlungsquellen zu verwenden. Bei den Strahlungsquellen kann es sich beispielhaft um Laser, lichtemittierende Dioden, Glüh- oder Gasentladungslampen handeln. Als dem Fachmann bekannte geeignete Detektoren kommen z. B. Avalanche Photodioden oder sonstige Photodioden sowie Photomultiplier in Betracht. Bevorzugt sind Mittel zur Einzelphotonendetektion.

In einer weiteren Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens und der Vorrichtung ist es besonders vorteilhaft, zur Erzeugung des Meßvolumens und/oder des Hilfsfokus ein Objektiv mit einer hohen numerischen Apertur, bevorzugt größer 0,9, und/oder einem kleinen Arbeitsabstand zu wählen. Die Wahl eines geringen Arbeitsabstandes, insbesondere kleiner/gleich einem Millimeter, wirkt sich besonders günstig bei Fluoreszenzmessungen im Meßvolumen aus. Im Emissionsstrahlengang auftretende Absorption des Fluoreszenzlichtes verringert die Zählrate pro Molekül, d.h. die pro Molekül detektierte Fluoreszenzintensität. Dieser Effekt geht im Gegensatz zu den Erwartungen offenbar linear bzw. stärker als linear in das Signal-Rausch-Verhältnis ein, so daß sich ein geringer Arbeitsabstand als vorteilhaft erweist.

Der Scanvorgang kann bevorzugt folgendermaßen ausgeführt werden. Es wird ein konfokales Mikroskop zur optischen Erfassung eines Beobach-

tungsvolumens verwendet mit einer Strahlungsquelle, bevorzugt zur Erzeugung von Anregungslicht, einem dichroitischen Spiegel, von dem die auftreffende Strahlung der Strahlungsquelle reflektiert wird, einer mechanischen Apertur aufweisenden Objektivlinsenordnung, die die von dem dichroitischen Spiegel reflektierte Strahlung empfängt und auf das Beobachtungsvolumen fokussiert, und einer Beobachtungsoptikanordnung, die von dem Beobachtungsvolumen ausgehende und durch den dichroitischen Spiegel hindurchtretende Strahlung empfängt. Zwischen dem dichroitischen Spiegel und der Objektivlinsenordnung befindet sich eine Ablenkspiegelanordnung, die einen bevorzugt planen objektivseitigen Ablenkspiegel aufweist, der um eine Normalpunktlage oszillierbar angeordnet ist. Bei Oszillation des objektivseitigen Spiegels kreuzen sich die optischen Achsen des jeweils reflektierten Anregungslichtes in im wesentlichen einem gemeinsamen Schnittpunkt im Bereich der mechanischen Apertur der Objektivlinsenordnung. Die Oszillationsachse des objektivseitigen Ablenkspiegels ist gleich der Schnittlinie der von dem objektivseitigen Ablenkspiegel aufgespannten Ebene mit derjenigen Ebene, die durch den gemeinsamen Schnittpunkt der optischen Achsen der reflektierten Strahlung und senkrecht zur optischen Achse der reflektierten Strahlung bei in seiner Normalpunktlage befindlichem objektivseitigen Ablenkspiegel verläuft. Eine entsprechende Vorrichtung ist in der internationalen Patentanmeldung PCT/EP 97/03022 (internationale Veröffentlichungsnummer WO 97/48001) detailliert beschrieben, auf die hiermit ausdrücklich Bezug genommen wird. Es lassen sich jedoch auch andere, dem Fachmann bekannte Verfahren zur Ablenkung des von der Strahlungsquelle erzeugten Strahles einsetzen. Wahlweise ist es auch möglich, die Position des Substrates oder der verwendeten Mikroskopoptik(en) mittelbar oder unmittelbar zu variieren.

Als optische Parameter können beispielsweise Streulichtintensitäten, Fluoreszenzintensitäten bei mindestens einer Wellenlänge, Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit von der Polarisation, Fluoreszenzlebensdauern und/oder molekulare Helligkeiten bestimmt werden. Es kann hierbei bevorzugt sein, molekulare Helligkeiten gemäß des in der Internatio-

nen Offenlegungsschrift WO 98/16814 beschriebenen Verfahrens zu bestimmen. Es wird dort beschrieben, daß Intensitätsfluktuationen emittierter Strahlung von in einem Meßvolumen befindlichen Partikeln mittels eines Detektors beobachtet werden, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfaßt: wiederholte Messung der Anzahl von Photonen pro Zeitintervall definierter Länge; Bestimmung einer Funktion, wie beispielsweise einer Verteilungsfunktion, der Anzahl von Photonen pro Zeitintervall; und sodann Bestimmung einer Funktion, wie auch hier beispielsweise einer Verteilungsfunktion, der spezifischen partikulären Helligkeiten auf Basis der Funktion der Anzahl der Photonen pro Zeitintervall. Es werden weiterhin Hinweise gegeben, wie die Funktion der Anzahl von Photonen prozeßiert werden kann oder wie beispielsweise instrumentelle Parameter angemessen berücksichtigt werden können. Physikalische Eigenschaften von Partikeln, insbesondere partikuläre Helligkeiten, können aber auch wie in der Internationalen Patentanmeldung PCT/EP 98/06165 dargelegt ermittelt werden. Das dort beschriebene Verfahren umfaßt die folgenden Schritte: wiederholte Messung der Dauer von Zeitabschnitten zwischen detektierten Photonen; Bestimmung einer Funktion, z.B. einer Verteilungsfunktion, der Dauer der genannten Zeitabschnitte; und sodann Bestimmung einer Funktion spezifischer physikalischer Eigenschaften der zu untersuchenden Partikel auf Basis der genannten Funktion der Dauer von Zeitabschnitten. Es wird insbesondere ein Fittingprozeß bezüglich experimentell bestimmter und theoretischer Funktion der Dauer der Zeitintervalle vorgeschlagen, wobei hinsichtlich der theoretischen Funktion Parameter einer räumlichen Helligkeitsfunktion, welche für die instrumentelle Anordnung charakteristisch ist, berücksichtigt werden. Es wird vorgeschlagen, beispielsweise Fluoreszenzpolarisation, wellenlängenabhängige Fluoreszenzintensitäten, Fluoreszenzlebensdauern, Energietransfer, etc. zu untersuchen. In einer weiteren Ausführungsform kann es vorteilhaft sein, mehrere optische Parameter zu ermitteln, um somit eine verbesserte Charakterisierung der Entität zu erzielen. Dies kann insbesondere mittels des in der Internationalen Patentanmeldung PCT/EP 98/03505 beschriebenen Verfahrens erfolgen. Es wird hier folgendes Verfahren vorgeschlagen: Bestimmung von Intensitätsfluktuationen emittierter Strahlung von in

einem Meßvolumen befindlichen Partikeln mittels mindestens eines Detektors; Bestimmung intermediärer statistischer Daten beinhaltend eine mindestens zwei-dimensionale statistische Funktion auf Basis der genannten Intensitätsfluktuationen; Bestimmung von Informationen auf Basis der intermediären statistischen Daten. Im letzten Schritt kann z.B. das gemeinschaftliche Auftreten von zwei Eigenschaften an einem Partikel untersucht werden. Auf den Offenbarungsgehalt der genannten Patentanmeldungen, insbesondere im Hinblick auf die zu untersuchenden physikalischen Eigenschaften der zu untersuchenden Partikel, ihre Bestimmung sowie die Bestimmung der intermediären statistischen Daten, wird hiermit ausdrücklich Bezug genommen.

Das erfindungsgemäße Verfahren und die zu seiner Durchführung verwendete Vorrichtung eignen sich beispielsweise zur Bestimmung optischer Parameter von Entitäten wie Molekülen, Molekülkomplexen, Polymeren, vesikulären Strukturen, aus z.B. Polymeren oder anorganischen Materialien aufgebaute Partikel aller Art, Zellen, Bakterien und Viren. Diese können z.B. auf mineralischen oder organischen Substraten angeordnet sein. Hierbei kann es sich insbesondere um polymere Gele, polymere oder aus anorganischen Materialien aufgebaute Partikel, vesikuläre Strukturen, Zellen, Bakterien und Viren handeln.

In einer weiteren Ausführungsform werden a-priori-Informationen über die Verteilung und/oder Struktur der Entitäten und/oder der Substrate in der Signalverarbeitung genutzt. So können beispielsweise als Substrat Bakterien oder polymere Kugeln (sog. Beads) eingesetzt werden, auf deren Oberfläche oder in deren Inneren jeweils bevorzugt gleichartige Entitäten angeordnet sind. Um mit Methoden der Signalverarbeitung, insbesondere der Bildverarbeitung, Meßwerte als zusammengehörig erkennen zu können, ist es oftmals hilfreich, a-priori-Informationen über die zu untersuchenden Substrate, wie beispielsweise deren Gestalt, räumliche Ausdehnung, Anordnung etc., in der Signalverarbeitung zu berücksichtigen. So kann es ferner vorteilhaft sein, über die zu als gleichartig erkannten Entitäten gehörigen Meßwerte jeweils Mittelwerte zu bilden oder diese ander-

weitig statistisch auszuwerten, um die Charakterisierung der Entitäten signifikanter zu gestalten. Als Methoden der Signalverarbeitung können an sich in der Literatur bekannte Verfahren zur Objekterkennung eingesetzt werden, wie z. B. Hough-Transformation, Template Matching und korrelative Verfahren. Derartige Verfahren sind in der Literatur beschrieben (siehe z.B. E. R. Davies, Machine Vision: Theory, Algorithms, Practicalities, Academic Press, London - San Diego, 2nd edition, 1997).

Oftmals ist es wünschenswert, durch bestimmte optische Parameter ausgezeichnete Entitäten und/oder Substrate von den übrigen Entitäten und/oder Substraten zu separieren, um sie einer weiteren Analyse und/oder Bearbeitung zu unterziehen. Diese Separation kann beispielsweise mittels eines geeigneten Manipulators, wie z. B. einer Pipette, eines mechanischen Greifers etc. geschehen. Besonders geeignete Verfahren sind beispielhaft in der Internationalen Offenlegungsschrift WO 95/35492 beschrieben, auf deren Offenbarungsgehalt hiermit ausdrücklich Bezug genommen wird. So wird dort beispielsweise die Entnahme bzw. Separation durch elektrische Spannungs- oder Feldimpulse, durch Druckdifferenzpulse oder auch durch Lichtdruckpulse beschrieben. Es kann auch ein bevorzugt piezogesteuertes Pump- bzw. Dispensiersystem verwendet werden. Im allgemeinen ist es hilfreich, während des Scanvorgangs die ermittelten Meßwerte in Abhängigkeit der Position des Meßvolumens zu erfassen, um somit den Separationsvorgang zu automatisieren.

Das Verfahren und die entsprechende Vorrichtung lassen sich insbesondere in der Wirkstoffsuchforschung, kombinatorischen Chemie, funktionalen Genomanalyse, evolutiven Biotechnologie, Diagnostik, Materialuntersuchung oder Proteom-Analyse einsetzen.

In einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden beispielsweise Beadstrukturen als Substrate eingesetzt, die jeweils mit einer Vielzahl gleichartiger Entitäten besetzt sind oder die solche enthalten. Diese Entitäten können beispielsweise aus einem Prozeß der kombinatorischen Chemie entstanden sein, wobei in der Regel die eigentliche

Struktur der Entität nicht bekannt ist. Die Entitäten können vorzugsweise detektierbare Marker, wie z.B. Fluoreszenzfarbstoffe, aufweisen. Diese Variante birgt den Vorteil, daß die nachfolgend zuzusetzenden Reaktionspartner nicht zwangsläufig detektierbare Marker aufweisen müssen. Die Substrate befinden sich vorzugsweise auf einem Träger, z.B. Mikrotiterplatten mit einer Vielzahl von Ausnehmungen oder einer folienartigen Struktur. Die Ober- oder Unterseite des Trägers kann in dieser Ausführung als Grenzfläche zur Nachführung des Hilfsfokus und Meßvolumens genutzt werden. Es werden nunmehr Reaktionspartner zugesetzt, deren Wechselwirkungen mit den Entitäten untersucht werden sollen. Diese Reaktionspartner können in einer Ausgestaltung ebenfalls detektierbare Marker aufweisen. Das Substrat wird sodann abgescannt mit beispielsweise dem Ziel, potentielle Binder der Reaktionspartner unter den Entitäten zu finden und/oder eine chemische Reaktion auszulösen. Die Bindung zwischen Reaktionspartner und Entität kann mit den oben näher beschriebenen optischen Parametern charakterisiert werden. Mit gewünschten Eigenschaften ausgestattete Komplexe zwischen Reaktionspartner und Entität können von den übrigen Entitäten bzw. Substraten separiert werden, um sie einer weiteren Analyse und/oder Behandlung zu unterziehen. Das beschriebene Verfahren wird vorzugsweise in der Wirkstoffsuche angewendet.

In einer weiteren Variante ist zwischen dem Substrat und den einen detektierbaren Marker aufweisenden Entitäten eine spaltbare Linkerstruktur angeordnet. So können z.B. in einem Prozeß der chemischen Synthese auf Substraten, wie polymeren Beads, spaltbare Linkerstrukturen angeordnet sein, die mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt werden, an denen sodann die zu untersuchenden Entitäten bevorzugt in einem kombinatorischen Verfahren synthetisiert werden. Diese Variante birgt den Vorteil, daß nach Selektion von Beads, welche mit gewünschten Eigenschaften ausgestattete Komplexe zwischen Reaktionspartner und Entität tragen, eine Abspaltung der farbstoffmarkierten Entität erfolgen kann und diese sodann in einem sogenannten löslichen Assay näher analysiert werden kann. Auch diese Variante eignet sich besonders in der Wirkstoffsuche.

In einer weiteren Ausgestaltung werden Substrate mit Entitäten bekannter Struktur verwendet, wobei alle Substrate die gleichen Entitäten aufweisen. Bevorzugt werden auch hier die Substrate auf die Ausnehmungen von Mikro- oder Nanotiterplatten verteilt. Sodann wird in jede der Ausnehmungen eine Lösung von Reaktionspartnern, von denen bekannt ist, daß sie mit den Entitäten wechselwirken, zugesetzt. Zudem werden die Ausnehmungen mit Lösungen unterschiedlicher potentieller Wirkstoffe versetzt, um festzustellen, ob diese geeignet sind, die Wechselwirkung zwischen Entität und Reaktionspartner zu beeinflussen.

Die in den vorstehenden Absätzen näher beschriebenen Ausgestaltungen können auch mit biologischen Substraten, wie z.B. Viren, Phagen, Bakterien, Pilze oder eukaryotischen Zellen, ausgeführt werden. So können z.B. natürlich vorkommende oder geklonte Entitäten bevorzugt an Oberflächen der genannten biologischen Substrate untersucht werden mit dem Vorteil, daß hier eine Kopplung zwischen dem als wünschenswert identifizierten Phänotyp mit seinem zugehörigen Genotyp vorliegt. Eine derartige Vorgehensweise ist unter den einschlägigen Begriffen des Phage-Displays oder zellulären Displays bekannt.

In einer weiteren Applikation kann das erfindungsgemäße Verfahren auch in zellulären Reporterassays hilfreich sein. Die Genauigkeit des Scanverfahrens, insbesondere die genaue Ortsauflösung, erlaubt die Beobachtung der Aufnahme und/oder intrazellulären Translokation von Substanzen mit einer überraschend hohen Ortsauflösung sowie Quantifizierungsgenauigkeit.

In vorteilhafter Weise ermöglicht das erfindungsgemäße Verfahren auch die Untersuchung von Signaltransduktionswegen. Es zeichnet sich insbesondere auch dadurch aus, daß mit Primärzellen gearbeitet werden kann und somit auf eine Überexprimierung der zu untersuchenden Entitäten, wie z.B. Rezeptoren, verzichtet werden kann.

Das Verfahren kann zudem im sog. differentiellen Display angewendet werden, in dem beispielsweise Zellen erkrankter Personen mit denen gesunder Personen verglichen werden. Weitere Vergleichsmöglichkeiten beinhalten: behandelte / unbehandelte Zellen, Wildtyp / Mutante, etc.

Weitere Applikationen betreffen die Untersuchung molekularer Interaktionen, wie z.B. Protein-Protein-Wechselwirkungen und Protein-Nukleinsäure-Wechselwirkungen. Insbesondere können auch Wechselwirkungen zwischen Proteinen oder Peptiden unbekannter Natur bzw. Funktion mit Liganden potentieller physiologischer Signifikanz, deren Struktur jedoch oftmals noch nicht aufgeklärt ist, untersucht werden. Hierbei wird vorzugsweise mindestens ein Partner mit einer partikulären Struktur chemisch oder adsorptiv verkoppelt sein.

Es kann auch bevorzugt sein, das erfindungsgemäße Verfahren sowie die zugehörige Vorrichtung im Rahmen der Gelelektrophorese einzusetzen. In Kombination mit einem Separations- bzw. Isolierungsvorgang können bestimmte Entitäten auf dem als Substrat dienenden Gel direkt einer weiteren Analyse oder auch Vervielfältigung (PCR, etc.) zugeführt werden.

Das Verfahren und die erfindungsgemäße Vorrichtung können auch eingesetzt werden, um selten vorkommende Zelltypen zu detektieren und bevorzugt zu isolieren, wie dies z.B. in der Pränataldiagnostik, in der Onkologie oder allgemein der Pathologie der Fall ist.

Nachfolgend werden bevorzugte Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens respektive der Vorrichtung dargestellt.

Figur 1 beschreibt schematisch eine konfokale Mikroskopanordnung mit einer Strahlungsquelle und zwei Detektoren, von denen einer Signale aus dem Hilfsfokus und der andere Signale aus dem Meßvolumen detektiert.

Figur 2 zeigt schematisch eine weitere erfindungsgemäße Ausgestaltung einer konfokalen Mikroskopanordnung, in der Meßvolumen und Hilfsfokus entlang der optischen Achse getrennt voneinander angeordnet sind. Die Anordnung weist eine zusätzliche Strahlungsquelle zur Erzeugung des Hilfsfokus auf.

Figur 3 zeigt eine Variante, in der getrennte Optiken zur Erzeugung von Hilfsfokus und Meßvolumen eingesetzt werden. Es wird exemplarisch gezeigt, daß Hilfsfokus und Meßvolumen sowohl in axialer wie auch lateraler Richtung getrennt voneinander angeordnet sein können.

Figur 4 beschreibt eine weitere erfindungsgemäße Ausführung, in der Hilfsfokus und Meßvolumen wiederum durch dieselbe Optik erzeugt werden. In dieser Variante werden zwei Detektoren für das aus dem Hilfsfokus reflektierte Licht eingesetzt, die entlang der optischen Achse zueinander versetzt sind, um die Richtung von Abweichungen der Position des Hilfsfokus zu erkennen.

Figur 5 beschreibt eine Ausführungsform, wobei als Grenzfläche der Übergang eines Substrates zur angrenzenden Luftschicht dient. Über unterschiedliche Ausnutzung der Numerischen Apertur des verwendeten Objektivs werden unterschiedliche Größen von Hilfsfokus und Meßvolumen erzielt.

Figur 6 zeigt eine Ausgestaltung mit einem faseroptischen Koppler.

Figur 7 a und b zeigen das Ergebnis des in Ausführungsbeispiel 2 dargestellten Experimentes.

In Figur 1 ist zunächst eine konfokale Anordnung dargestellt: Die Strahlung aus einer Strahlungsquelle 10 wird durch eine Optik 33 kollimiert und durch ein Objektiv 32 auf das zu untersuchende Substrat 60 fokussiert. Die Strahlungsquelle 10 emittiert Licht verschiedener Wellenlängen. Austauschbare optische Mittel 35 mit wellenlängenabhängiger Brechkraft

trennen dieses Licht in Bündel unterschiedlicher Konvergenz, die vom Objektiv 32 in unterschiedlichen Positionen fokussiert werden, so daß ein Hilfsfokus 71 und ein Meßvolumen 70 generiert werden. Durch die Wahl der Linse 35 kann somit der gewünschte Abstand zwischen Hilfsfokus 71 und Meßvolumen 70 vom Anwender eingestellt werden. In der beispielhaft dargestellten Anordnung liegt der Hilfsfokus 71 auf der Grenzfläche 62 zwischen Substrat 60 und Träger 61, das Meßvolumen 70 hingegen innerhalb des Substrates 60. Aus dem Meßvolumen 70 austretende Streu- oder Fluoreszenzstrahlung wird wiederum durch das Objektiv 32 gebündelt und über den Strahlteiler 40, der z. B. als teildurchlässiger oder wellenlängenabhängiger Spiegel ausgeführt sein kann, ganz oder teilweise reflektiert. Die reflektierte Strahlung wird durch eine Optik 30 auf eine Blende 50 fokussiert, die zum Meßvolumen 70 konfokal angeordnet ist. Die durch die Blende hindurchtretende Strahlung fällt auf den Detektor 20, der zur Aufnahme des Meßsignals dient. Bei Verwendung der Mehrphotonenanregung kann auf die Blende 50 verzichtet werden.

Über einen weiteren Strahlteiler 41, eine Optik 31 und eine ebenfalls konfokal angeordnete Blende 51 wird ein Teil der an der Grenzfläche 62 reflektierten Strahlung aus dem Hilfsfokus 71 auf den Detektor 21 gelenkt. In der in der vorliegenden Figur dargestellten Ausführungsform wird beispielsweise die fokussierende Optik 32 entlang der optischen Achse auf- und abbewegt werden, um somit die aktuelle Position des Hilfsfokus 71 relativ zur Grenzfläche 62 bestimmen und ggf. nachregeln zu können. Hierdurch erfolgt eine mittelbare Nachführung des Meßvolumens 70.

Figur 2 zeigt eine weitere Variante der konfokalen Anordnung, in der Meßvolumen 70 und Hilfsfokus 71 entlang der optischen Achse getrennt voneinander angeordnet sind. Die konventionelle konfokale Strahlungs- und Detektionseinheit aus Strahlungsquelle 10, Detektor 20 und den zugehörigen optischen Elementen wurde bereits in Figur 1 erörtert. In dieser Ausführungsform wird eine separate Strahlungsquelle 11 zur Erzeugung des Hilfsfokus 71 verwendet. Durch die Optik 31 wird das vom Strahlteiler 42 reflektierte Licht dieser Strahlungsquelle im gezeigten Beispiel zu ei-

nem konvergenten Strahl gebündelt, so daß der vom Objektiv 32 erzeugte Hilfsfokus 71 in einem geringeren Abstand vom Objektiv 32 liegt als das Meßvolumen 70, das durch Fokussierung eines parallelen Strahlenbündels durch das Objektiv 32 entsteht. Der Hilfsfokus 71 ist wiederum auf der Grenzfläche 62 zwischen Substrat 60 und Träger 61 angeordnet, die an der Grenzfläche 62 reflektierte Strahlung wird über das Objektiv 32 und die Optik 31 auf die konfokal angeordnete Blende 51 fokussiert und vom Detektor 21 erfaßt. Durch geeignete Positionierung der Optik 31 kann in dieser Ausführung der Hilfsfokus 71 in einer wählbaren Distanz vom Meßvolumen 70 angeordnet werden. Es ist bevorzugt, den Hilfsfokus 71 auf der Grenzfläche 62 zu positionieren und das Meßvolumen 70 in einem gewünschten Abstand vom Hilfsfokus 71 innerhalb des Substrates 60 zu erzeugen. In einer weiteren Ausführungsform kann der Hilfsfokus 71 aus einem vor dem Objektiv 32 divergenten Strahlenbündel erzeugt werden, so daß der Hilfsfokus 71 in einer größeren Entfernung vom Objektiv 32 als das Meßvolumen 70 angeordnet ist. Der in Figur 1 beschriebene Such- und Regelmechanismus kann auch hier vorteilhafterweise angewendet werden.

Figur 3 stellt eine weitere erfindungsgemäße Ausgestaltung dar, in der ein separates Objektiv 34 zur Erzeugung des Hilfsfokus 71 eingesetzt wird. Das Meßvolumen 70 wird wiederum über das Objektiv 32 erzeugt und abgebildet; die dem Objektiv 32 nachgeordneten Komponenten der konventionellen konfokalen Anordnung sind bereits in Figur 1 erörtert worden. Die Positionen der Objektive 32 und 34 sind steuerungstechnisch oder mechanisch miteinander gekoppelt. Zur Erzeugung des Hilfsfokus 71 wird eine separate Strahlungsquelle 11 verwendet, deren Strahlung über eine Optik 35 kollimiert und durch das Objektiv 34 auf die Grenzfläche 62 zwischen Substrat 60 und Träger 61 fokussiert wird. Aus dem Hilfsfokus 71 reflektierte Strahlung wird wiederum durch das Objektiv 34 gebündelt und über den Strahlteiler 42 reflektiert. Die reflektierte Strahlung wird durch eine Optik 31 auf eine zum Hilfsfokus 71 konfokale Blende 51 fokussiert; die durch die Blende 51 hindurchtretende Strahlung fällt auf den Detektor 21. In der beispielhaft dargestellten Anordnung sind Hilfsfokus 71 und

Meßvolumen 70 sowohl in axialer wie auch lateraler Richtung getrennt voneinander angeordnet. Der in Figur 1 beschriebene Such- und Regelmechanismus kann auch hier vorteilhafterweise angewendet werden.

Figur 4 zeigt eine Variante der in Figur 2 dargestellten Ausführung der Erfindung, in der zwei Detektoren 21, 22 für das aus dem Hilfsfokus 71 reflektierte Licht eingesetzt werden. Entsprechende Anordnungen von zwei oder mehr Detektoren können auch in den Ausführungen gemäß Figur 1 oder 3 verwendet werden. Die konventionelle Anordnung zur Bestrahlung und Beobachtung des Meßvolumens 70 ist ausgeführt wie in Figur 1 erörtert. Meßvolumen 70 und Hilfsfokus 71 sind in der beispielhaft gezeigten Anordnung deckungsgleich eingestellt. Durch andere Positionierung der Linsen 30 – 35 können jedoch gewünschte Abstände zwischen Meßvolumen 70 und Hilfsfokus 71 eingestellt werden.

Der Hilfsfokus 71 liegt wiederum auf der Grenzfläche 62 zwischen Substrat 60 und Träger 61. Die an der Grenzfläche 62 reflektierte Strahlung wird durch das Objektiv 32 und den Strahlteiler 41 in Richtung der Detektoren 21, 22 gelenkt. Die Strahlung wird mittels eines weiteren Strahlteilers 43 auf die Detektoren 21, 22 aufgeteilt. Beiden Detektoren sind fokussierende Optiken 34, 35 sowie Blenden 51, 52 vorgeordnet. Die Blenden 51 und 52 sind dabei vor bzw. hinter der jeweiligen konfokalen Position angeordnet, wenn der Hilfsfokus 71 auf der Grenzfläche 62 liegt. Verändert sich nunmehr die relative Lage von Hilfsfokus 71 und Grenzfläche 62 zueinander, so werden die Detektoren 21, 22 eine veränderte Intensitätsverteilung des Rückreflexes erfassen. Abhängig von der Richtung der Lageänderung des Hilfsfokus 71, der in Richtung des Substrates 60 oder des Trägers 61 verschoben sein kann, wird entweder auf dem Detektor 21 oder dem Detektor 22 eine erhöhte bzw. erniedrigte Intensität der aus dem Hilfsfokus 71 stammenden Strahlung auftreten. Dementsprechend kann auf die in Figur 1 beschriebene Suchbewegung verzichtet werden.

Figur 5 zeigt eine weitere Variante der in Figur 2 dargestellten Ausführung der Erfindung. Die konventionelle Anordnung zur Bestrahlung und Beob-

achtung des Meßvolumens 70 wurde bereits erörtert. Meßvolumen 70 und Hilfsfokus 71 sind in der beispielhaft gezeigten Anordnung deckungsgleich eingestellt; ihre relative Lage zueinander kann jedoch durch geeignete Positionierung der Linse 31 verändert werden. Als Grenzfläche 62 dient nunmehr der Übergang zwischen Substrat 60 und angrenzender Luft 63. Die für die Erzeugung des Meßvolumens 70 verwendete Optik 32 wird hinsichtlich ihrer Numerischen Apertur nur teilweise genutzt. Hingegen erfolgt eine breitere Ausleuchtung der Optik 32 zur Erzeugung des Hilfsfokus 71. Durch die Blende 53 wird bei der Abbildung des Meßvolumens 70 auf die konfokal angeordnete Blende 50 und ihren korrespondierenden Detektor 20 ebenfalls die Numerische Apertur des Detektionsstrahlenganges begrenzt. Diese Ausführungsform resultiert in einer geringeren Fokusgröße von Hilfsfokus 71 im Vergleich zum Meßvolumen 70. Somit kann die Amplitude der oben beschriebenen Suchbewegungen des Hilfsfokus 71 so klein gewählt werden, daß die Meßwertaufnahme aus dem Meßvolumen 70 nahezu unbeeinflusst bleibt und dennoch etwaige Abweichungen des Hilfsfokus 71 von der Grenzfläche 62 erkannt und korrigiert werden können.

Figur 6 zeigt eine weitere Ausgestaltung des optischen Aufbaus zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens in Anlehnung an Figur 2. Die konventionelle Anordnung zur Bestrahlung und Beobachtung des Meßvolumens 70 wurde bereits erörtert. Als Strahlungsquelle 11 zur Erzeugung des Hilfsfokus 71 wird bevorzugt ein Halbleiterlaser eingesetzt, dessen Ausgangsstrahlung in eine optische Faser 81 eingekoppelt wird. Der faseroptische Koppler 42 entspricht dem „klassischen“ Strahlteiler in Figur 2. Die Strahlung aus dem Hilfsfokus 71 wird in dieser Ausführung in den Kern einer optischen Faser 80 eingekoppelt, der die in Figur 2 dargestellte Lochblende 51 in ihrer Funktion ersetzt. Nach Passieren des faseroptischen Kopplers 42 wird die Strahlung mittels optischer Faser 82 auf einen Detektor 21 geleitet. Die optischen Fasern können Monomode- oder Multimodefasern sein.

Figur 7 a zeigt Theophyllin-Beads, die mit den in Ausführungsbeispiel 2 genannten Antikörpern versetzt wurden. Die hohe Auflösung zeigt, daß die lokal erhöhte Konzentration fluoreszenter Antikörper am Bead sich deutlich vom Hintergrundsignal der in Lösung befindlichen fluoreszenten Antikörper unterscheidet. Figur 7 b zeigt die Negativkontrolle ohne Zusatz des ersten Antikörpers, so daß der zweite fluoreszenzmarkierte Antikörper sich nicht an das Bead anlagert und im Bild die charakteristische Ringstruktur erzeugt.

Nachfolgend wird in Ausführungsbeispiel 1 eine spezifische Ausgestaltung A des erfindungsgemäßen Verfahrens sowie in Ausführungsbeispiel 2 eine konkrete biologische Anwendung detailliert dargestellt.

Ausführungsbeispiel 1

Das vorliegende Ausführungsbeispiel entspricht im wesentlichen dem in Figur 6 dargestellten Aufbau. Als Strahlungsquelle zur Erzeugung des Hilfsfokus 71 wird ein Halbleiterlaser 11 mit einer Leistung von 3 mW und einer Wellenlänge von 780 nm eingesetzt. Die Ausgangsstrahlung des Lasers 11 wird über eine Monomode-Glasfaser 81 zu einem faseroptischen Y-Koppler 42 geführt. Eine weitere Monomode-Glasfaser 80 am Ausgang des Kopplers 42 dient sowohl zur Zuführung der Strahlung für den Hilfsfokus 71 als auch zur konfokalen Detektion des an der Grenzfläche 62 reflektierten Lichtes.

Zur Bündelung der zugeführten bzw. detektierten Strahlung dient ein Achromat 31 mit einer Brennweite von 40 mm. Durch Änderung des Abstandes zwischen dem freien Ende der Faser 80 und dem Achromaten 31 kann die Konvergenz des zum Objektiv 32 geführten Strahlenbündels, und damit die Lage des Hilfsfokus 71 relativ zum Meßvolumen 70, variiert werden. In der hier beschriebenen Ausführung ist durch eine Verschiebung des Achromaten 31 über insgesamt 5 mm die Distanz zwischen Meßvolumen 70 und Hilfsfokus 71 zwischen 0 µm und 100 µm einstellbar.

Das hier eingesetzte Objektiv 32 ist ein Standard-Mikroskopobjektiv mit 40-facher Vergrößerung und einer Numerischen Apertur von 1,2. Es ist auf einem piezoelektrischen Translator montiert, der eine Verschiebung des Objektivs entlang der optischen Achse über eine Strecke von 100 µm ermöglicht. Die Grenzfrequenz für diese Bewegung liegt, bedingt durch die Antriebskraft des Translators sowie die Masse des eingesetzten Objektivs, bei etwa 400 Hz.

Als Grenzfläche 62 wird in dieser beispielhaften Ausführung der Übergang von einem gläsernen Träger 61 (Brechungsindex $n_1 \approx 1.52$) zum Substrat 60, das in diesem Fall aus einer wäßrigen Suspension von polymeren Ku-

geln (Brechungsindex $n_2 \approx 1.33$) besteht, verwendet. Die von der Grenzfläche 62 reflektierte Strahlung wird über das Objektiv 32 und den Achromaten 31 wiederum auf die Faser 80 gelenkt, deren optischer Kern die Funktion der in Figur 1 bis 5 dargestellten Lochblende 51 übernimmt, also eine konfokale Detektion gewährleistet. Über den Koppler 42 gelangen 50% der Strahlungsleistung auf den Detektor 21, der als Silizium-Photodiode mit nachgeschaltetem Transimpedanzverstärker (Verstärkung 10^8 V/A) ausgeführt ist.

Das Ausgangssignal des Detektors 21 wird über einen 14-Bit Analog-Digital-Wandler einem digitalen Signalprozessor (DSP) zugeführt. Dieser DSP steuert über einen 14-Bit Digital-Analog-Wandler und einen nachgeschalteten Hochspannungsverstärker auch den piezoelektrischen Translator des Objektivs 32. Zur Steuerung der Nachführung wird das Objektiv mit einer typischen Frequenz von 200 Hz und einer Amplitude von $0,5 \mu\text{m}$ sinusförmig auf- und abbewegt. Über eine zu dieser Suchbewegung synchrone Demodulation der vom Detektor 21 aufgenommenen Intensität bestimmt der DSP die Richtung einer eventuellen Abweichung zwischen der Position der Grenzfläche 62 und der (über die sinusförmige Bewegung zeitlich gemittelten) Position des Hilfsfokus 71. Eine ggf. festgestellte Abweichung wird durch eine der Sinusbewegung überlagerte Nachführung des Objektivs 32 ausgeglichen.

In der konfokalen Meßeinrichtung wird als Detektor 20 eine aktiv gequenchte Avalanche Photodiode eingesetzt. Die Lochblende 50 weist einen Durchmesser von $50 \mu\text{m}$ auf. Als Strahlungsquelle 10 dient ein He-Ne-Laser mit 543 nm Ausgangswellenlänge, dessen Lichtleistung auf $100 \mu\text{W}$ abgeschwächt wird.

Ausführungsbeispiel 2

Im vorliegenden Ausführungsbeispiel werden als Substrat sog. Tenta-Gel™ - Beads des Typs S PHB-Gly (RAPP Polymere) eingesetzt. Diese sind konjugiert mit Theophyllinmolekülen (Aldrich) als Entitäten. Die Bela-

derung der Beads beträgt 9%. 5 mg der Beads werden in 444 μ l PBS-Puffer suspendiert. Als Probenträger werden Lab-Tek Chambered Coverglasses, #1 Borosilicat, steril, 8-well (Nunc Nalge International, Lot.Nr. 148116-0605) verwendet. Als erster Antikörper wird ein polyklonaler Kaninchen Anti-Theopyllin-Antikörper (Europa Research, Lot.Nr. 80 17 15) verwendet. Als zweiter Antikörper dient ein fluoreszenzmarkierter (TRITC, Tetramethylrhodamin-5-(und 6)-isothiocyanat) Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (DAKO, Lot.Nr. 077(101)). Der Assaypuffer, nachfolgend TNT genannt, setzt sich wie folgt zusammen: 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.01% Tween-20.

Der Assay wird wie folgt durchgeführt: 8 μ l Beadsuspension werden mit 100 μ l einer 1:2000 Verdünnung des ersten Antikörpers versetzt und für 30 min. bei Raumtemperatur geschüttelt. Es folgt ein zweimaliger Waschschritt mit TNT-Puffer (0.01% Tween-20). 100 μ l einer Verdünnung 1:5000 des zweiten Antikörpers werden zugesetzt und für eine Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt. Sodann werden 200 μ l TNT-Puffer zugesetzt.

Zur Erzeugung des Anregungsstrahlenganges hinsichtlich des Meßvolumens 70 wird ein HeNe-Laser mit einer Emissionswellenlänge von 543 nm eingesetzt. Als für das Fluoreszenzspektrum von TRITC geeigneter Bandpaßfilter wird detektionsseitig ein Bandpaß mit einer mittleren Durchlaß-Wellenlänge von 580 nm und einer Halbwertsbreite von 30 nm eingesetzt.

Das Ergebnis des Ausführungsbeispiels 2 ist in den Figuren 7 a und b dargestellt. Die aufgenommenen Meßwerte werden zunächst einem Bildverarbeitungsschritt unterzogen, der dazu dient, die einzelnen Beads zu identifizieren und zu lokalisieren. In der hier beschriebenen Ausführung wird hierzu die Hough-Transformation verwendet. Im Anschluß werden zu jedem identifizierten Bead diejenigen Meßwerte ermittelt, die Punkte auf der Beadoberfläche kennzeichnen. Hierzu ist es vorteilhaft, a-priori-Informationen einzusetzen, wie etwa in diesem Fall die Erwartung, daß die

optischen Schnitte durch die Beadoberfläche annähernd kreisförmige Strukturen ergeben. Im vorliegenden Fall werden, jeweils entlang radial vom Zentrum der identifizierten Beads ausgehender Suchbahnen, die Meßwerte maximaler Intensität ermittelt. Alternativ können in diesem Schritt aus der Literatur bekannte Verfahren wie Kantenverstärkung und/oder Schwellwertanalyse verwendet werden.

Patentansprüche

1. Verfahren zur optischen Erfassung mindestens einer Entität, wobei
 - die mindestens eine Entität auf und/oder in einem, bevorzugt auf einem Träger (61) befindlichen, Substrat (60) angeordnet ist, dessen Brechungsindex verschieden ist von mindestens einer an das Substrat (60) angrenzenden Komponente,
 - die mindestens eine Entität mit einem Meßvolumen (70) unter Verwendung mindestens einer konfokalen oder für die Mehrphotonenanregung ausgelegten Einrichtung, bestehend aus Strahlungsquelle (10) und mindestens einem Objektiv (32), gescannt wird unter Erhalt von Meßwerten optischer Parameter und die Meßwerte zur Charakterisierung der mindestens einen Entität mittels Signalverarbeitung bearbeitet werden,
 - die mindestens eine Entität für die Dauer der Aufnahme der Meßwerte ihre Position hinsichtlich des Substrates (60) und/oder des Trägers (61) im wesentlichen beibehält,
 - vor und/oder während des Scanvorganges ein Hilfsfokus (71) unter Verwendung mindestens einer Strahlungsquelle (11) und einer Optik (34) erzeugt wird, der zumindest teilweise auf der Grenzfläche (62) zwischen Substrat (60) und angrenzender Komponente oder einer sonstigen in definierter räumlicher Beziehung zur Entität stehenden Grenzfläche (62) liegt,
 - ein Rückreflex aus dem Hilfsfokus (71) von einem konfokal angeordneten Detektor (21) oder mehreren Detektoren (21,22), die entlang der optischen Achse der den Hilfsfokus (71) erzeugenden Optik (34) vor und/oder hinter der Bildebene angeordnet sind, erfaßt wird und zur Messung der Lage der Grenzfläche (62) und somit zur mittelbaren Positionierung des Meßvolumens (70) genutzt wird, und
 - die Position des Hilfsfokus (71) relativ zum Meßvolumen (70) definiert eingestellt ist oder einstellbar ist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Hilfsfokus (71) mittels derselben Strahlungsquelle (10) und/oder derselben Optik

(32) erzeugt wird, die auch zur Erzeugung des Meßvolumens (70) dient.

3. Verfahren nach Anspruch 1 und/oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Ausdehnung des konfokal detektierten Volumens des Hilfsfokus (71) insbesondere in Richtung der jeweiligen optischen Achsen der Optiken (32, 34) geringer ist als die Ausdehnung des Meßvolumens (70).

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß zwecks Erzielung der geringeren Ausdehnung des konfokal detektierten Volumens des Hilfsfokus (71) dieser mittels einer Optik (34) mit einer Numerischen Apertur erzeugt wird, die größer ist als die Numerische Apertur der zur Erzeugung des Meßvolumens (70) verwendeten Optik (32).

5. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß zwecks Erzielung der geringeren Ausdehnung des konfokal detektierten Volumens des Hilfsfokus (71) zur Erzeugung des Meßvolumens (70) ein geringerer Teil der Numerischen Apertur einer gemeinsamen oder der jeweiligen Optiken (32, 34) genutzt wird als zur Erzeugung des Hilfsfokus (71).

6. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß zwecks Erzielung der geringeren Ausdehnung des konfokal detektierten Volumens des Hilfsfokus (71) eine konfokal angeordnete Blende (51) bei der Detektion des Hilfsfokus (71) verwendet wird, die eine geringere Öffnung aufweist als eine bei der Detektion des Meßvolumens (70) verwendete, konfokal angeordnete Blende (50).

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß zur mittelbaren Positionierung des Meßvolumens (70) die Position des Hilfsfokus (71) relativ zur Grenzfläche (62) im wesentlichen entlang der optischen Achse der den Hilfsfokus (71) erzeugenden Optik (34) bevorzugt periodisch bewegt wird, die Intensität des Rückreflexes in Abhängigkeit von der Bewegung von dem Detektor (21) registriert wird und die Lage des Hilfsfokus (71) derart nachgeregelt wird, daß die Intensität des Rückreflexes ihr Maximum erreicht.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß zur mittelbaren Positionierung des Meßvolumens (70) die Position des Hilfsfokus (71) relativ zur Grenzfläche (62) sowohl lateral zur optischen Achse der den Hilfsfokus (71) erzeugenden Optik (34) als auch axial bewegt wird.

9. Verfahren nach Anspruch 7 und/oder 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Amplitude der bevorzugt periodischen Bewegung des Hilfsfokus (71) kleiner als oder gleich der axialen Ausdehnung des Meßvolumens (70) ist.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Intensität des Rückreflexes mittels mindestens zweier Detektoren (21, 22) erfaßt wird und die Lage der Grenzfläche (62) aus der Verteilung der von den Detektoren (21, 22) erfaßten Intensitäten bestimmt wird.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei als optische Parameter die Streulichtintensität und/oder die Streulichtintensität in Abhängigkeit von der Polarisierung und/oder die Fluoreszenzintensität bei mindestens einer Wellenlänge und/oder die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Polarisierung und/oder die Fluoreszenzlebensdauer und/oder molekulare Helligkeiten und/oder Raman-Streuung und/oder Lumineszenz aufgenommen werden.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei mineralische oder organische Substrate (60), insbesondere polymere Gele, polymere Partikel, aus anorganischen Materialien aufgebaute Partikel, vesikuläre Strukturen, Zellen, Bakterien und Viren eingesetzt werden.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei als Entitäten Moleküle, Molekülkomplexe, Polymere, polymere Partikel, aus anorganischen Materialien aufgebaute Partikel, vesikuläre Strukturen, Zellen, Bakterien und Viren eingesetzt werden.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, wobei anhand der optischen Parameter ausgewählte Entitäten und/oder Substrate (60) während oder im Anschluß an den Scanvorgang von den übrigen Entitäten und/oder Substraten (60) getrennt werden.

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14 zur Anwendung in der Wirkstoffsuche, der funktionalen Analyse kombinatorisch-chemischer oder kombinatorisch-biologischer Syntheseprodukte, der funktionalen Genomanalyse, der evolutiven Biotechnologie, der Diagnostik, der Proteomanalyse oder der Materialuntersuchung.

16. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1 mit

- mindestens einer Strahlungsquelle (10) sowie mindestens einer konfokalen oder für die Mehrphotonenanregung ausgelegten Einrichtung bestehend aus Objektiv (32) und mindestens einem Detektor (20) zur Aufnahme von Meßwerten aus einem Meßvolumen (70),
- mindestens einer Strahlungsquelle (11) sowie mindestens einer weiteren Einrichtung bestehend aus Objektiv (34) und mindestens einem Detektor (21) zur Aufnahme eines Rückreflexes aus einem Hilfsfokus (71), wobei ein konfokal angeordneter Detektor (21) oder mehrere Detektoren (21,22), die entlang der optischen Achse der den Hilfsfokus (71) erzeugenden Optik (34) vor und/oder hinter der Bildebene angeordnet sind, verwendet werden,
- mindestens einer Einrichtung zur Positionierung von Meßvolumen (70) und Hilfsfokus (71) relativ zu einem Substrat (60) und
- einer Einrichtung zur variablen Positionierung des Hilfsfokus (71) relativ zum Meßvolumen (70).

17. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1 mit

- mindestens einer Strahlungsquelle (10) sowie mindestens einer konfokalen oder für die Mehrphotonenanregung ausgelegten Einrichtung bestehend aus Objektiv (32) und mindestens einem Detektor (20) zur Aufnahme von Meßwerten aus einem Meßvolumen (70),

- mindestens einer Strahlungsquelle (11) sowie mindestens einer weiteren Einrichtung bestehend aus Objektiv (34) und mindestens einem Detektor (21) zur Aufnahme eines Rückreflexes aus einem Hilfsfokus (71), wobei ein konfokal angeordneter Detektor (21) oder mehrere Detektoren (21,22), die entlang der optischen Achse der den Hilfsfokus (71) erzeugenden Optik (34) vor und/oder hinter der Bildebene angeordnet sind, verwendet werden,
- mindestens einer Einrichtung zur Positionierung von Meßvolumen (70) und Hilfsfokus (71) relativ zu einem Substrat (60),
- wobei der Hilfsfokus (71) relativ zum Meßvolumen (70) definiert eingestellt ist.

18. Vorrichtung nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Einrichtung zur Positionierung von Meßvolumen (70) und Hilfsfokus (71) relativ zu einem Substrat (60) Mittel zur Positionierung des Hilfsfokus (71) relativ zum Meßvolumen (70) umfaßt.

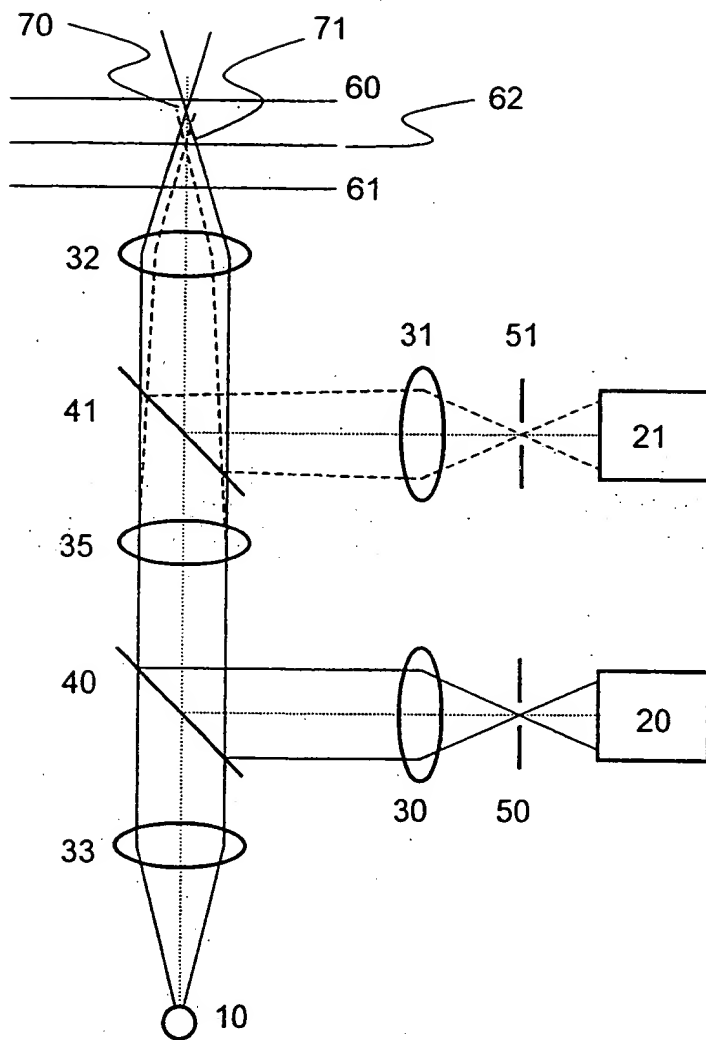
19. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 16 und/oder 18, dadurch gekennzeichnet, daß zur Erzeugung von Meßvolumen (70) und Hilfsfokus (71) dieselbe Strahlungsquelle (10) und/oder Optik (32) verwendet wird.

20. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 16, 18 oder 19, dadurch gekennzeichnet, daß die Einrichtung zur Positionierung des Hilfsfokus (71) relativ zum Meßvolumen (70) Mittel zur Einstellung der relativen Position der Optiken (32, 34) zueinander umfaßt.

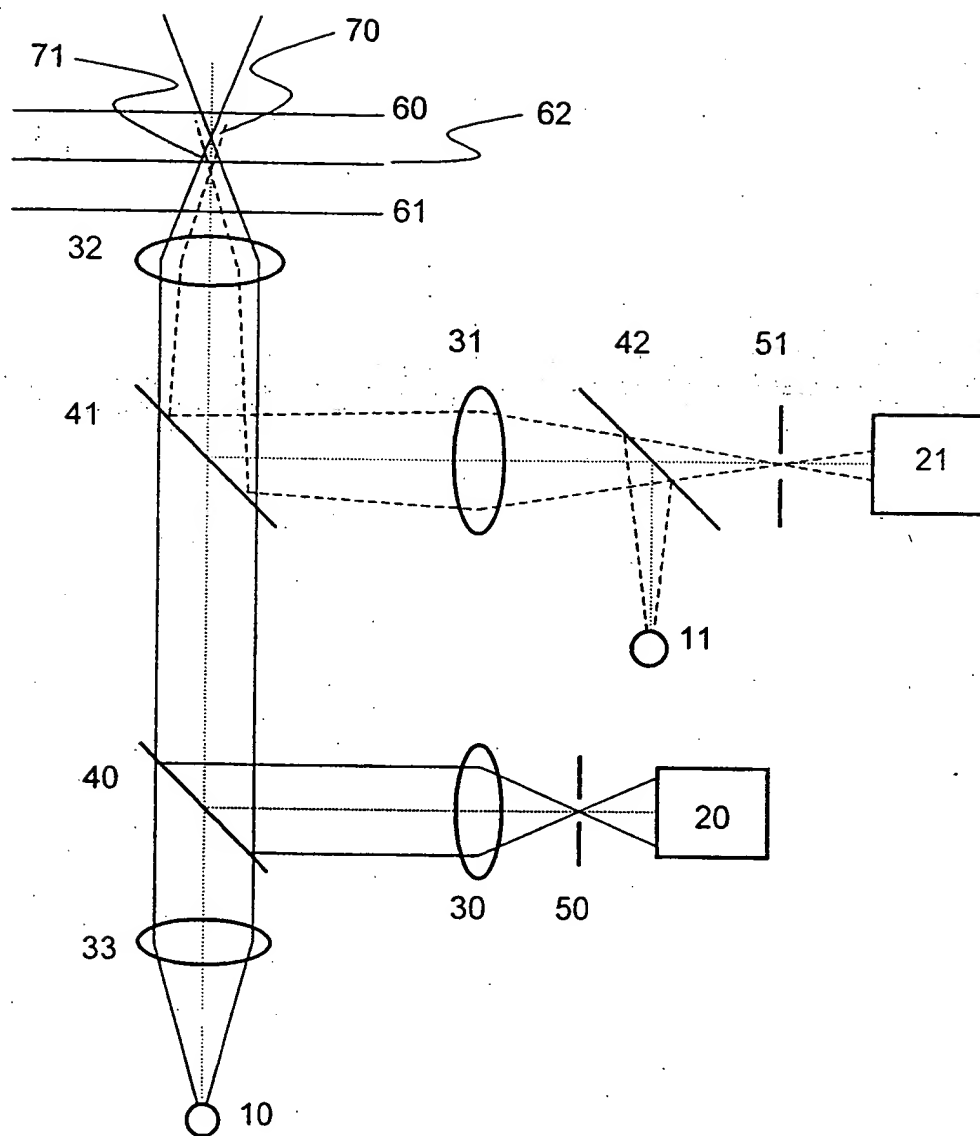
21. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 16, 18, 19 oder 20, dadurch gekennzeichnet, daß die Einrichtung zur Positionierung des Hilfsfokus (71) relativ zum Meßvolumen (70) Mittel zur Variation der Konvergenz derjenigen Strahlenbündel umfaßt, welche zur Erzeugung des Hilfsfokus (71) und des Meßvolumens (70) von der jeweiligen Optik (32, 34) fokussiert werden.

22. Verwendung der Vorrichtung nach einem der Ansprüche 16 bis 21 in

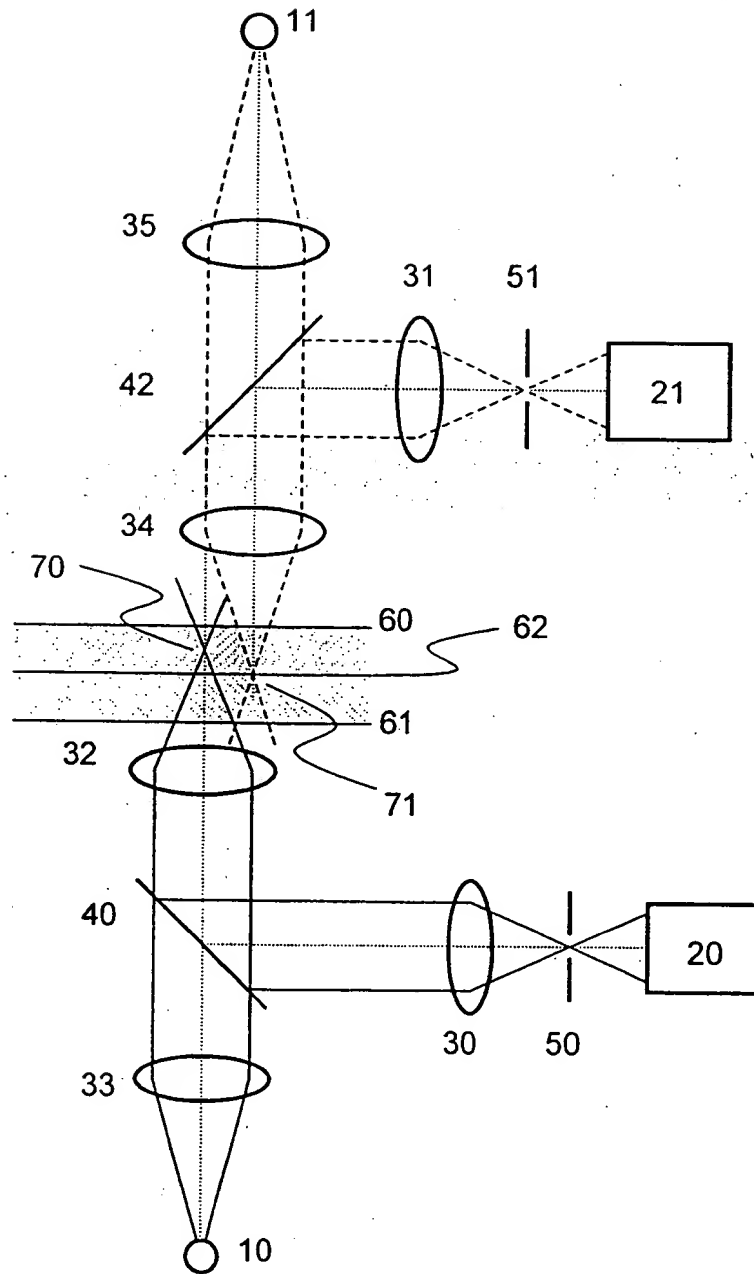
der Wirkstoffsuche, der funktionalen Analyse kombinatorisch-chemischer oder kombinatorisch-biologischer Syntheseprodukte, der funktionalen Genomanalyse, der evolutiven Biotechnologie, der Diagnostik, der Proteomanalyse oder der Materialuntersuchung.



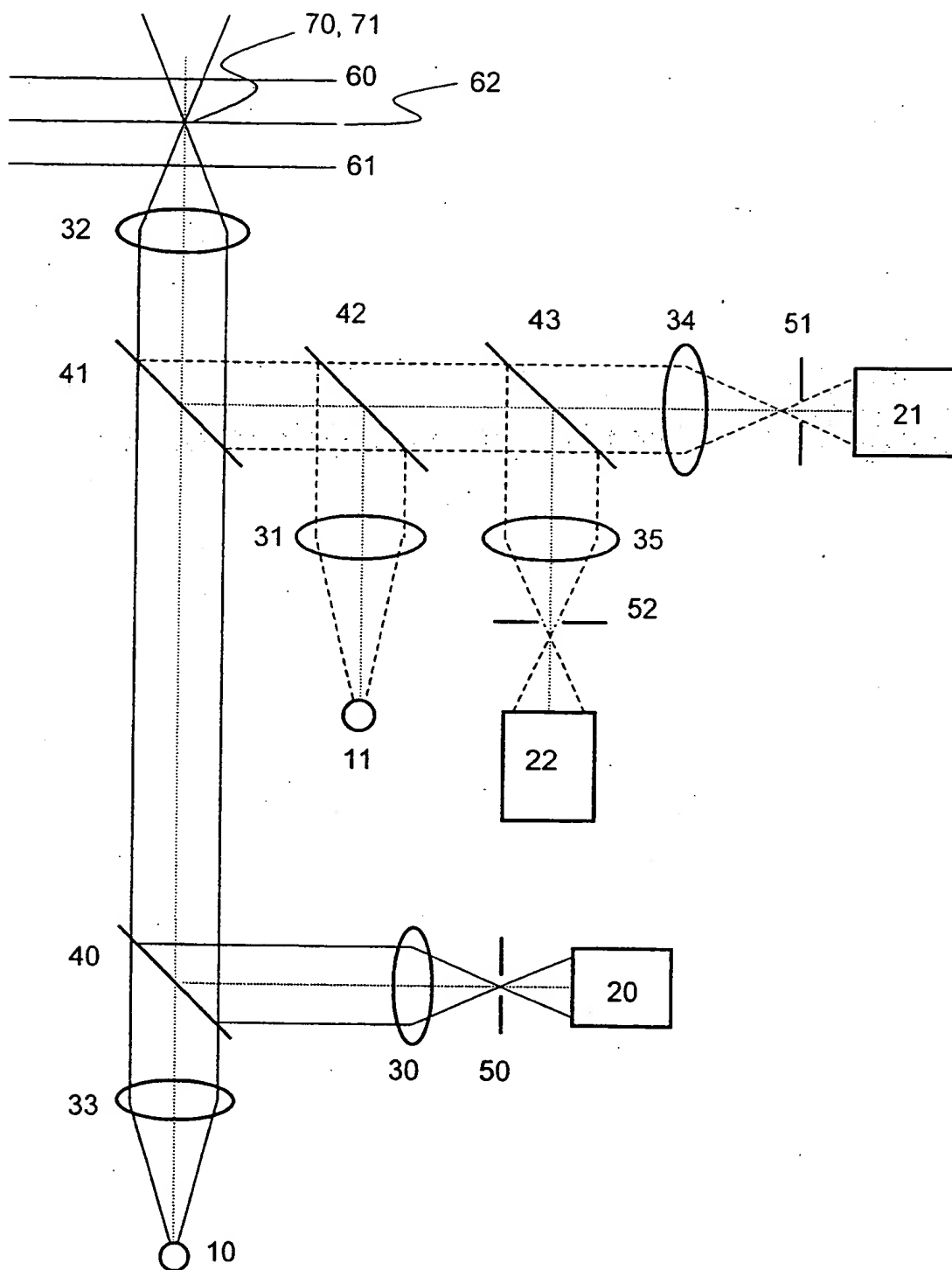
Figur 1



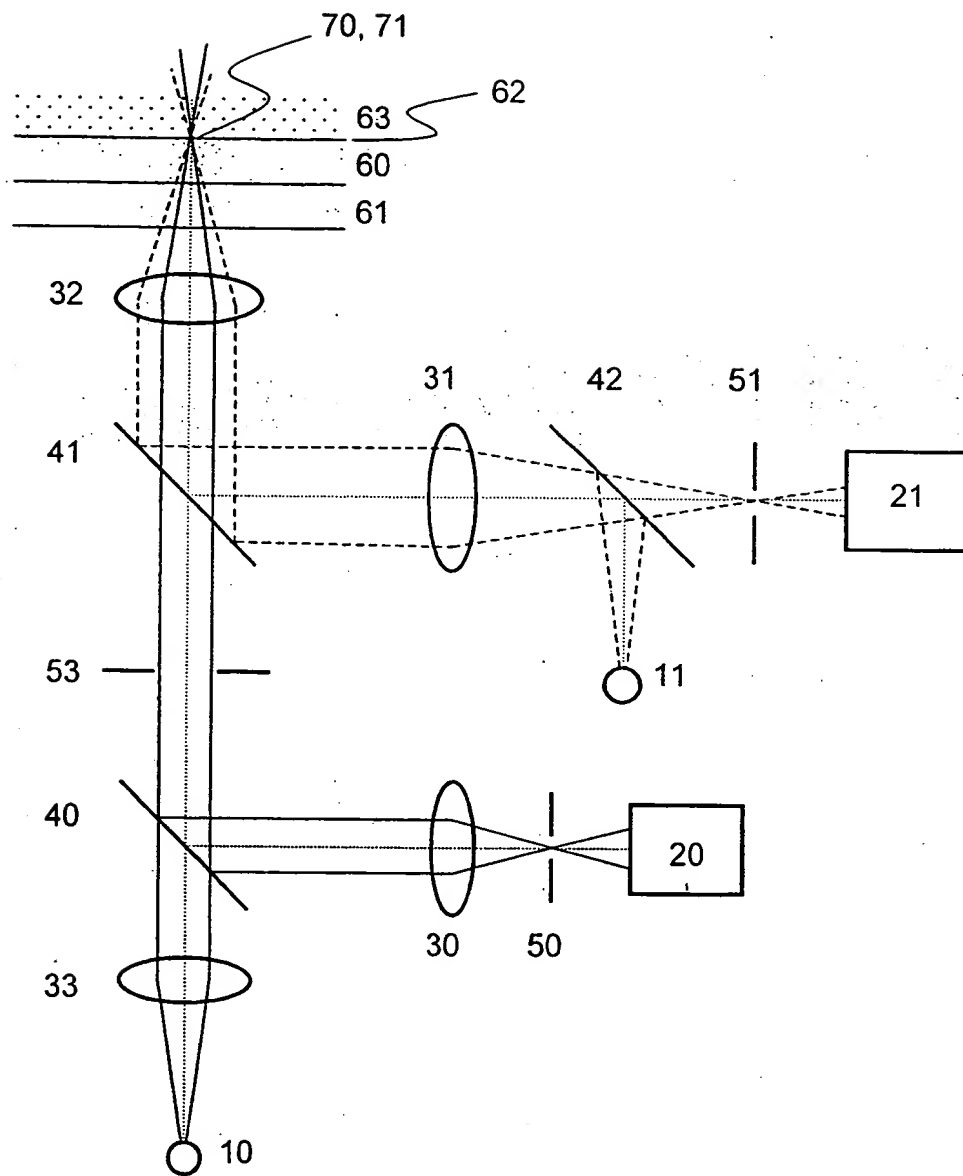
Figur 2



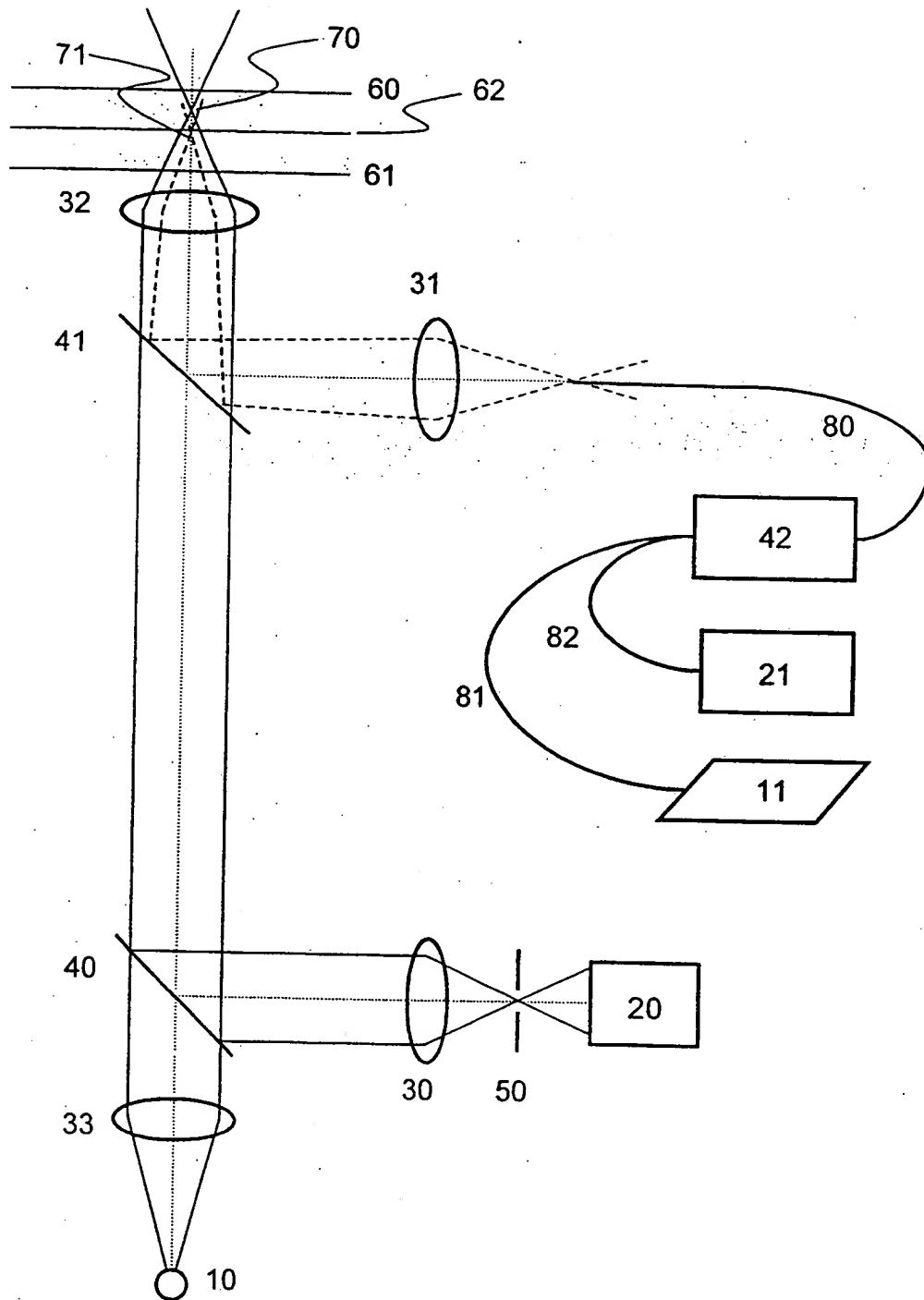
Figur 3



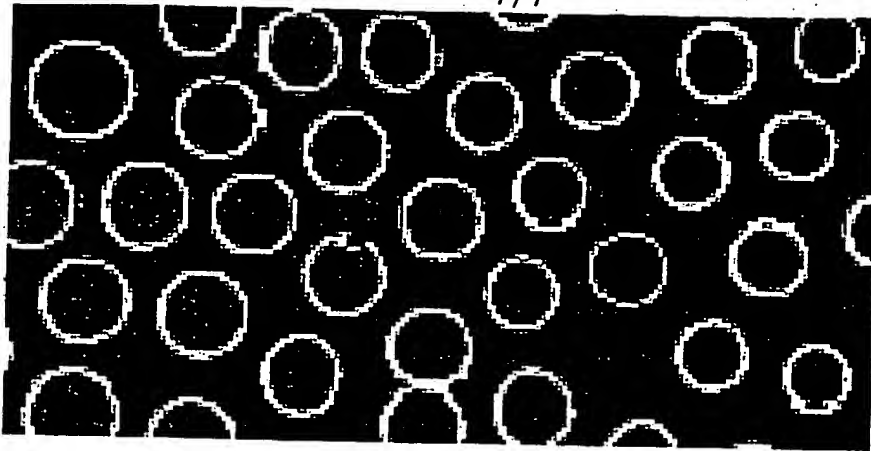
Figur 4



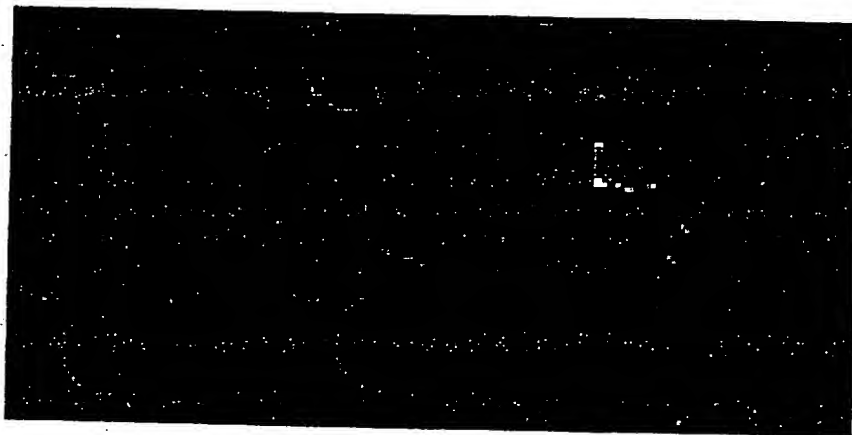
Figur 5



Figur 6



Figur 7a



Figur 7b

09/8680
(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
29. Juni 2000 (29.06.2000)

PCT

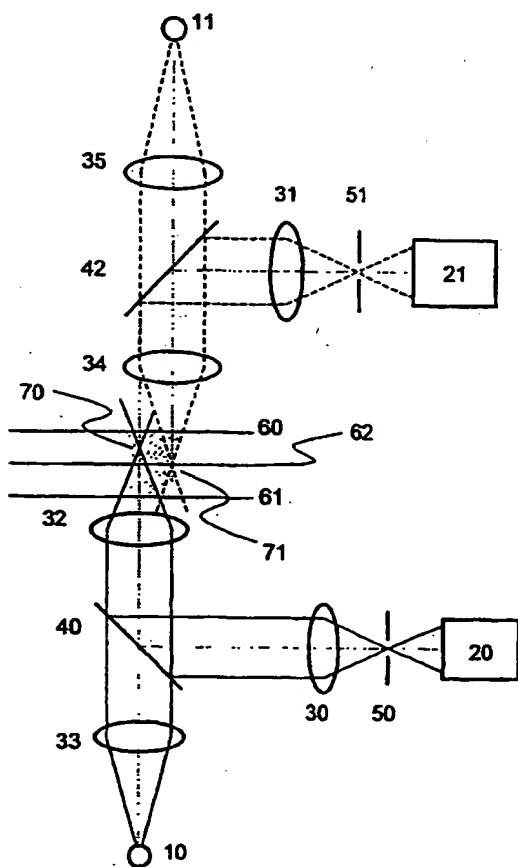
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 00/37984 A3

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: G02B 21/00 (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): EVOTEC BIOSYSTEMS AG [DE/DE]; Schnackenburgallee 14, D-22525 Hamburg (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/10142 (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MÜLLER, Jürgen, Rolf [DE/DE]; Glückstrasse 4a, D-22081 Hamburg (DE).
- (22) Internationales Anmeldedatum: 21. Dezember 1999 (21.12.1999) (74) Anwälte: MEYERS, Hans-Wilhelm usw.; Von Kreisler Selting Werner, Postfach 10 22 41, D-50462 Köln (DE).
- (25) Einreichungssprache: Deutsch (81) Bestimmungsstaaten (national): JP, US.
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch (84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
- (30) Angaben zur Priorität:
60/113,478 21. Dezember 1998 (21.12.1998) US
98124314.0 21. Dezember 1998 (21.12.1998) EP
198 60 549.8 21. Dezember 1998 (21.12.1998) DE

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: POSITIONING OF THE MEASURING VOLUME IN A SCANNING MICROSCOPIC METHOD

(54) Bezeichnung: POSITIONIERUNG DES MESSVOLUMENS IN EINEM SCANNING-MIKROSKOPISCHEN VERFAHREN



(57) Abstract: The invention relates to a method for optically detecting at least one entity arranged on a substrate (60). The at least one entity is scanned with a measuring volume (70) using at least one radiation source (11) and at least one set of confocal optics (32) or using a set of optics (32) configured for multi-photon excitation. Said entity essentially maintains the same position with regard to the substrate (60) and/or the support (61) for the duration of the recording of the measured values. An auxiliary focus (71) is generated before and/or during the scanning process while using at least one radiation source (11) and at least one set of optics (34). Said auxiliary focus lies at least partially on the contact surface (62) between the substrate (60) and the adjacent component or on another contact surface (62) located in a defined spatial relationship with regard to the entity. A retroreflection from the auxiliary focus (71) is detected in a confocal manner by at least one detector (21), is used for measuring the position of the contact surface (62) and is thus used for indirectly positioning the measuring volume (70). According to the inventive method, the position of the auxiliary focus (71) in relation to the measuring volume (70) can be adjusted in a defined manner.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur optischen Erfassung mindestens einer Entität, die auf einem Substrat (60) angeordnet ist. Die mindestens eine Entität wird mit einem Messvolumen (70) unter Verwendung mindestens einer Strahlungsquelle (11) und einer konfokalen Optik (32) oder einer für die Mehrphotonenanregung ausgelegten Optik (32) gescannt. Sie behält für die Dauer der Aufnahme der Messwerte ihre Position hinsichtlich des Substrates (60) vor und/oder des Trägers (61) im wesentlichen bei. Vor und/oder während des Scanvorganges wird ein Hilfsfokus (71) unter Verwendung mindestens einer Strahlungsquelle (11) und einer Optik (34) erzeugt, der zumindest teilweise auf der

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 00/37984 A3

**Veröffentlicht:**

— mit internationalem Recherchenbericht

**(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts:**

18. Oktober 2001

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.*

Grenzfläche (62) zwischen Substrat (60) und angrenzender Komponente oder einer sonstigen in definierter räumlicher Beziehung zur Entität stehenden Grenzfläche (62) liegt. Ein Rückreflex aus dem Hilfsfokus (71) wird von mindestens einem Detektor (21) konfokal erfasst und zur Messung der Lage der Grenzfläche (62) und somit zur mittelbaren Positionierung des Messvolumens (70) genutzt. In dem erfindungsgemäßen Verfahren ist die Position des Hilfsfokus (71) relativ zum Messvolumen (70) definiert einstellbar.

International application No.
PCT/EP 99/10142

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 99/10142

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 95 22058 A (AFFYMAX TECH NV; STERN DAVID (US); FIEKOWSKY PETER (US); TRULSON M) 17 August 1995 (1995-08-17) cited in the application	1,2,17
A	page 1, line 22 - line 28 page 10, line 34 - page 11, line 6; figure 1A page 16, line 41 - page 18, line 33 claim 1	16
X	US 5 062 715 A (NAKATA TOSHIHIKO ET AL) 5 November 1991 (1991-11-05) cited in the application	1,10,17
A	column 6, line 51 - column 8, line 6; figures 1,7	16
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 018, no. 436 (P-1786), 15 August 1994 (1994-08-15) & JP 06 137864 A (BROTHER IND LTD), 20 May 1994 (1994-05-20) cited in the application abstract	1,7,16, 17
A	US 5 084 612 A (IWASAKI OSAMU ET AL) 28 January 1992 (1992-01-28) cited in the application column 9, line 15 - line 61; figure 1	1,16,17
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 098, no. 004, 31 March 1998 (1998-03-31) & JP 09 325277 A (NIKON CORP), 16 December 1997 (1997-12-16) cited in the application abstract	1,16,17
A	US 4 844 617 A (KELDERMAN HERMAN F ET AL) 4 July 1989 (1989-07-04) column 9, line 34 - line 61; figure 9 column 14, line 18 - line 34	1,2,7,9
A	WO 92 15034 A (PHOENIX LASER SYSTEMS INC) 3 September 1992 (1992-09-03) the whole document	1,7,8,10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application N

PCT/EP 99/10142

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5248876 A	28-09-1993	JP 2047965 C JP 6094641 A JP 7085060 B	25-04-1996 08-04-1994 13-09-1995
DE 19713362 A	01-10-1998	WO 9844375 A EP 0904558 A	08-10-1998 31-03-1999
WO 9522058 A	17-08-1995	US 5631734 A	20-05-1997
US 5062715 A	05-11-1991	JP 2243956 A JP 2659429 B	28-09-1990 30-09-1997
JP 06137864 A	20-05-1994	NONE	
US 5084612 A	28-01-1992	JP 3251811 A JP 2608483 B JP 3200915 A	11-11-1991 07-05-1997 02-09-1991
JP 09325277 A	16-12-1997	NONE	
US 4844617 A	04-07-1989	NONE	
WO 9215034 A	03-09-1992	US 5162641 A AU 1444492 A CA 2104380 A CN 1067573 A EP 0572527 A JP 6505657 T US 5286964 A	10-11-1992 15-09-1992 20-08-1992 06-01-1993 08-12-1993 30-06-1994 15-02-1994

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inte. Jonaies Aktenzeichen

PCT/EP 99/10142

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 G02B21/00

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 G02B

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X A	US 5 248 876 A (KERSTENS PIETER J ET AL) 28. September 1993 (1993-09-28) Spalte 4, Zeile 27 - Spalte 5, Zeile 19; Abbildung 1	1,2,10, 17 16
X	DE 197 13 362 A (ZEISS CARL JENA GMBH) 1. Oktober 1998 (1998-10-01) Spalte 4, Zeile 5 - letzte Zeile; Abbildungen 1,3	1,2,16, 17

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie.

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

12. April 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

19/04/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Ciarrocca, M

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/10142

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 95 22058 A (AFFYMAX TECH NV ; STERN DAVID (US); FIEKOWSKY PETER (US); TRULSON M) 17. August 1995 (1995-08-17) in der Anmeldung erwähnt	1,2,17
A	Seite 1, Zeile 22 - Zeile 28 Seite 10, Zeile 34 - Seite 11, Zeile 6; Abbildung 1A Seite 16, Zeile 41 - Seite 18, Zeile 33. Anspruch 1	16
X	US 5 062 715 A (NAKATA TOSHIHIKO ET AL) 5. November 1991 (1991-11-05) in der Anmeldung erwähnt	1,10,17
A	Spalte 6, Zeile 51 - Spalte 8, Zeile 6; Abbildungen 1,7	16
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 018, no. 436 (P-1786), 15. August 1994 (1994-08-15) & JP 06 137864 A (BROTHER IND. LTD), 20. Mai 1994 (1994-05-20) in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung	1,7,16, 17
A	US 5 084 612 A (IWASAKI OSAMU ET AL) 28. Januar 1992 (1992-01-28) in der Anmeldung erwähnt Spalte 9, Zeile 15 - Zeile 61; Abbildung 1	1,16,17
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 098, no. 004, 31. März 1998 (1998-03-31) & JP 09 325277 A (NIKON CORP), 16. Dezember 1997 (1997-12-16) in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung	1,16,17
A	US 4 844 617 A (KELDERMAN HERMAN F ET AL) 4. Juli 1989 (1989-07-04) Spalte 9, Zeile 34 - Zeile 61; Abbildung 9 Spalte 14, Zeile 18 - Zeile 34	1,2,7,9
A	WO 92 15034 A (PHOENIX LASER SYSTEMS INC) 3. September 1992 (1992-09-03) das ganze Dokument	1,7,8,10

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/10142

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5248876 A	28-09-1993	JP 2047965 C JP 6094641 A JP 7085060 B	25-04-1996 08-04-1994 13-09-1995
DE 19713362 A	01-10-1998	WO 9844375 A EP 0904558 A	08-10-1998 31-03-1999
WO 9522058 A	17-08-1995	US 5631734 A	20-05-1997
US 5062715 A	05-11-1991	JP 2243956 A JP 2659429 B	28-09-1990 30-09-1997
JP 06137864 A	20-05-1994	KEINE	
US 5084612 A	28-01-1992	JP 3251811 A JP 2608483 B JP 3200915 A	11-11-1991 07-05-1997 02-09-1991
JP 09325277 A	16-12-1997	KEINE	
US 4844617 A	04-07-1989	KEINE	
WO 9215034 A	03-09-1992	US 5162641 A AU 1444492 A CA 2104380 A CN 1067573 A EP 0572527 A JP 6505657 T US 5286964 A	10-11-1992 15-09-1992 20-08-1992 06-01-1993 08-12-1993 30-06-1994 15-02-1994

Translation
09/868645

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

3

48
7.10.2

Applicant's or agent's file reference 992935wo Hi/go	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP99/10142	International filing date (day/month/year) 21 December 1999 (21.12.99)	Priority date (day/month/year) 21 December 1998 (21.12.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC G02B 21/00		
Applicant EVOTEC BIOSYSTEMS AG		

RECEIVED
JUL 02 2002
IC 2800 MAIL ROOM
10013
2001

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 7 sheets, including this cover sheet.
☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 9 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☒ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 20 July 2000 (20.07.00)	Date of completion of this report 27 March 2001 (27.03.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP99/10142

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1-25, as originally filed,
 pages _____, filed with the demand,
 pages _____, filed with the letter of _____,
 pages _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the claims, Nos. _____, as originally filed,
 Nos. _____, as amended under Article 19,
 Nos. _____, filed with the demand,
 Nos. 1-22, filed with the letter of 27 January 2001 (27.01.2001),
 Nos. _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the drawings, sheets/fig 1/7-7/7, as originally filed,
 sheets/fig _____, filed with the demand,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP 99/10142

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1, 3 - 21	YES
	Claims	2	NO
Inventive step (IS)	Claims	1, 3 - 21	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1 - 21	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

1. The citations are designated in the sequence in which they appear in the search report:

D1: US-A-5 248 876
D2: DE-A-197 13 362
D3: WO-A-95/22058
D4: US-A-5 062 715
D5: PATENT ABSTRACTS OF JAPAN for JP-A-06 137 864
D6: US-A-5 084 612
D7: PATENT ABSTRACTS OF JAPAN for JP-A-09 325 277
D8: US-A-4 844 617
D9: WO-A-92/15034.

2. For the following reasons, the device of Claim 15 appears to meet the requirements of PCT Article 33:

- 2.1 In addition to other devices, D1, D2, D4, D7 and D8 describe optical apparatus for scanning objects, two beam bundles being focused on the object (see, for example, D1, Figure 16). Both a first beam bundle for measuring purposes and a second beam bundle for measuring or autofocus adjustment are focused on the object by means of a common lens.

- 2.2 The claimed device differs from this prior art by the use of a second lens for the second beam bundle.
- 2.3 The other available documents are less relevant since their optical apparatus scan the object with one beam that is focused onto the object by one lens.
- 2.4 Since none of the citations discloses the use of a second lens for a second beam bundle, it follows that the claimed device is also not suggested by the available prior art.
- 2.5 The same observation applies to method Claim 1, since it contains corresponding features.
3. For the same reasons as Claim 15, the device of Claim 17 appears to be novel and non-obvious with respect to the prior art.
4. For the following reasons, the device of Claim 16 appears to meet the requirements of PCT Article 33:
- 4.1 D1 and D2 describe devices which record vertical sections using differently coloured beam sources in conjunction with a chromatic lens. The beam sources and chromate determine the spacing between the vertical sections (see D1, Figure 16; D2, Figure 3).
- 4.2 The device of Claim 16 differs therefrom *inter alia* by a variable adjustment of the vertical section spacing relative to a reference.
- 4.3 The other citations are not concerned with the recording of vertical sections. In as much as these

citations describe autofocusing systems, the aim appears to be the placing of the volume to be measured exactly in the autofocusing plane.

- 4.4 Since none of the available prior art documents discloses or proposes the possibility of variable adjustment between the vertical section layers, the device of Claim 16 can be considered non-obvious with respect to the available prior art.
- 4.5 This observation applies similarly to the second alternative of method Claim 2, which is mentioned in the final paragraph, provided that the term "adjustable" is interpreted as "variably adjustable" in the sense of the device claim.
5. The first alternative of Claim 2, which is defined in the final paragraph, does not meet the novelty requirements of PCT Article 33.
- 5.1 Figure 16 and the associated description in D1 disclose a method of optically determining an object, wherein:
- * an object (538) is disposed on a carrier (120);
 - * the object is scanned by a lens (532) using a confocal arrangement (see arrow (54));
 - * the object is a semiconductor element, for example, and thus maintains its position for the duration of the measurement (see column 3, paragraph 6);
 - * during the scanning process, a second focus is generated using the lens (see first focus with red filtered light and second focus with blue filtered light) which lies in another relation to a contact surface of the object (whatever the other

relationship is);

- * the red light being collimated by a first lens system (554) and the blue light being collimated by a second lens system (524);
- * a back reflex from the second focus being detected by a detector with a confocally disposed diaphragm (see element (540)) and being used to measure the position of a contact surface, such as for example the surface of the semiconductor element (see the figure); and
- * the position of the second focus being adjusted relative to the volume to be measured (set by the choice of colour filters).

As an alternative to a light source with colour filters, D1 discloses the use of a plurality of monochromatic light sources (see column 14, lines 46 to 50).

Thus the first alternative of Claim 2 is not novel since each feature has a counterpart in D1.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International Application No.
PCT/EP 99/10142

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

1. The application contains some unclear points and therefore does not comply with PCT Article 6.
 - 1.1 The embodiment in Figure 1 no longer appears to be covered by the claims. This inconsistency gives rise to uncertainty as to the claimed subjects.
 - 1.2 The variable adjustment of the spacing of the vertical section relative to a reference which is scanned by the auxiliary focus is only insufficiently defined by the term "adjustable" in the independent method claims. It would be more appropriate to use a term such as "variably adjustable" in accordance with the device claims.
 - 1.3 The reference in the independent method claims to a component adjoining the substrate without defining it further gives rise to uncertainty as to which surface is used as the reference.

It cannot be discerned which contact surface could be intended by the reference to "another contact surface in a defined spatial relationship".

PCT

REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

For receiving Office use only

International Application No.

International Filing Date

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference
(if desired) (12 characters maximum)

Box No. I TITLE OF INVENTION

Scanning Microscopic Method Having High Axial Resolution

Box No. II APPLICANT

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

EVOTEC BIOSYSTEMS AG
Schackenburgallee 114
22525 Hamburg
Germany

☐ This person is also inventor.

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

State (that is, country) of nationality:
Germany

State (that is, country) of residence:
Germany

This person is applicant
for the purposes of:

☐ all designated
States

☒ all designated States except
the United States of America

☐ the United States
of America only

☐ the States indicated in
the Supplemental Box

Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

MUELLER, Juergen, Rolf
Gluckstrasse 4a
22081 Hamburg
Germany

This person is:

☐ applicant only

☒ applicant and inventor

☐ inventor only (If this check-box
is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:
Germany

State (that is, country) of residence:
Germany

This person is applicant
for the purposes of:

☐ all designated
States

☐ all designated States except
the United States of America

☒ the United States
of America only

☐ the States indicated in
the Supplemental Box

☐ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.

Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:

☒ agent

☐ common representative

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

MEYERS, Hans-Wilhelm
von Kreisler Selting Werner
B.O. Box 10 22 41
50462 Koeln
Germany

Telephone No.

0221-91 65 20

Facsimile No.

0221-13 42 97

Teleprinter No.

☐ Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.

Box No.V DESIGNATION OF STATES

The following designations are hereby made under Rule 4.9(a) (mark the applicable check-boxes; at least one must be marked):

Regional Patent

- ☐ **AP ARIPO Patent:** GH Ghana, GM Gambia, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, SD Sudan, SL Sierra Leone, SZ Swaziland, UG Uganda, ZW Zimbabwe, and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT
- ☐ **EA Eurasian Patent:** AM Armenia, AZ Azerbaijan, BY Belarus, KG Kyrgyzstan, KZ Kazakhstan, MD Republic of Moldova, RU Russian Federation, TJ Tajikistan, TM Turkmenistan, and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT
- ☒ **EP European Patent:** AT Austria, BE Belgium, CH and LI Switzerland and Liechtenstein, CY Cyprus, DE Germany, DK Denmark, ES Spain, FI Finland, FR France, GB United Kingdom, GR Greece, IE Ireland, IT Italy, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Netherlands, PT Portugal, SE Sweden, and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT
- ☐ **OA OAPI Patent:** BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Central African Republic, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroon, GA Gabon, GN Guinea, GW Guinea-Bissau, ML Mali, MR Mauritania, NE Niger, SN Senegal, TD Chad, TG Togo, and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line)

National Patent (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line):

- | | |
|-------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> AE United Arab Emirates | <input type="checkbox"/> LR Liberia |
| <input type="checkbox"/> AL Albania | <input type="checkbox"/> LS Lesotho |
| <input type="checkbox"/> AM Armenia | <input type="checkbox"/> LT Lithuania |
| <input type="checkbox"/> AT Austria | <input type="checkbox"/> LU Luxembourg |
| <input type="checkbox"/> AU Australia | <input type="checkbox"/> LV Latvia |
| <input type="checkbox"/> AZ Azerbaijan | <input type="checkbox"/> MD Republic of Moldova |
| <input type="checkbox"/> BA Bosnia and Herzegovina | <input type="checkbox"/> MG Madagascar |
| <input type="checkbox"/> BB Barbados | <input type="checkbox"/> MK The former Yugoslav Republic of Macedonia |
| <input type="checkbox"/> BG Bulgaria | |
| <input type="checkbox"/> BR Brazil | <input type="checkbox"/> MN Mongolia |
| <input type="checkbox"/> BY Belarus | <input type="checkbox"/> MW Malawi |
| <input type="checkbox"/> CA Canada | <input type="checkbox"/> MX Mexico |
| <input type="checkbox"/> CH and LI Switzerland and Liechtenstein | <input type="checkbox"/> NO Norway |
| <input type="checkbox"/> CN China | <input type="checkbox"/> NZ New Zealand |
| <input type="checkbox"/> CU Cuba | <input type="checkbox"/> PL Poland |
| <input type="checkbox"/> CZ Czech Republic | <input type="checkbox"/> PT Portugal |
| <input type="checkbox"/> DE Germany | <input type="checkbox"/> RO Romania |
| <input type="checkbox"/> DK Denmark | <input type="checkbox"/> RU Russian Federation |
| <input type="checkbox"/> EE Estonia | <input type="checkbox"/> SD Sudan |
| <input type="checkbox"/> ES Spain | <input type="checkbox"/> SE Sweden |
| <input type="checkbox"/> FI Finland | <input type="checkbox"/> SG Singapore |
| <input type="checkbox"/> GB United Kingdom | <input type="checkbox"/> SI Slovenia |
| <input type="checkbox"/> GD Grenada | <input type="checkbox"/> SK Slovakia |
| <input type="checkbox"/> GE Georgia | <input type="checkbox"/> SL Sierra Leone |
| <input type="checkbox"/> GH Ghana | <input type="checkbox"/> TJ Tajikistan |
| <input type="checkbox"/> GM Gambia | <input type="checkbox"/> TM Turkmenistan |
| <input type="checkbox"/> HR Croatia | <input type="checkbox"/> TR Turkey |
| <input type="checkbox"/> HU Hungary | <input type="checkbox"/> TT Trinidad and Tobago |
| <input type="checkbox"/> ID Indonesia | <input type="checkbox"/> UA Ukraine |
| <input type="checkbox"/> IL Israel | <input type="checkbox"/> UG Uganda |
| <input type="checkbox"/> IN India | <input checked="" type="checkbox"/> US United States of America |
| <input type="checkbox"/> IS Iceland | |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japan | <input type="checkbox"/> UZ Uzbekistan |
| <input type="checkbox"/> KE Kenya | <input type="checkbox"/> VN Viet Nam |
| <input type="checkbox"/> KG Kyrgyzstan | <input type="checkbox"/> YU Yugoslavia |
| <input type="checkbox"/> KP Democratic People's Republic of Korea | <input type="checkbox"/> ZA South Africa |
| | <input type="checkbox"/> ZW Zimbabwe |
| <input type="checkbox"/> KR Republic of Korea | |
| <input type="checkbox"/> KZ Kazakhstan | |
| <input type="checkbox"/> LC Saint Lucia | |
| <input type="checkbox"/> LK Sri Lanka | |

Check-boxes reserved for designating States which have become party to the PCT after issuance of this sheet:

Precautionary Designation Statement: In addition to the designations made above, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all other designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) indicated in the Supplemental Box as being excluded from the scope of this statement. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit. (Confirmation of a designation consists of the filing of a notice specifying that designation and the payment of the designation and confirmation fees. Confirmation must reach the receiving Office within the 15-month time limit.)

Supplemental Box*If the Supplemental Box is not used, this sheet should not be included in the request.*

1. If, in any of the Boxes, the space is insufficient to furnish all the information: in such case, write "Continuation of Box No. ..." [indicate the number of the Box] and furnish the information in the same manner as required according to the captions of the Box in which the space was insufficient, in particular:

- (i) if more than two persons are involved as applicants and/or inventors and no "continuation sheet" is available: in such case, write "Continuation of Box No. III" and indicate for each additional person the same type of information as required in Box No. III. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below;
- (ii) if, in Box No. II or in any of the sub-boxes of Box No. III, the indication "the States indicated in the Supplemental Box" is checked: in such case, write "Continuation of Box No. II" or "Continuation of Box No. III" or "Continuation of Boxes No. II and No. III" (as the case may be), indicate the name of the applicant(s) involved and, next to (each) such name, the State(s) (and/or, where applicable, ARIPO, Eurasian, European or OAPI patent) for the purposes of which the named person is applicant;
- (iii) if, in Box No. II or in any of the sub-boxes of Box No. III, the inventor or the inventor/applicant is not inventor for the purposes of all designated States or for the purposes of the United States of America: in such case, write "Continuation of Box No. II" or "Continuation of Box No. III" or "Continuation of Boxes No. II and No. III" (as the case may be), indicate the name of the inventor(s) and, next to (each) such name, the State(s) (and/or, where applicable, ARIPO, Eurasian, European or OAPI patent) for the purposes of which the named person is inventor;
- (iv) if, in addition to the agent(s) indicated in Box No. IV, there are further agents: in such case, write "Continuation of Box No. IV" and indicate for each further agent the same type of information as required in Box No. IV;
- (v) if, in Box No. V, the name of any State (or OAPI) is accompanied by the indication "patent of addition," or "certificate of addition," or if, in Box No. V, the name of the United States of America is accompanied by an indication "continuation" or "continuation-in-part": in such case, write "Continuation of Box No. V" and the name of each State involved (or OAPI), and after the name of each such State (or OAPI), the number of the parent title or parent application and the date of grant of the parent title or filing of the parent application;
- (vi) if, in Box No. VI, there are more than three earlier applications whose priority is claimed: in such case, write "Continuation of Box No. VI" and indicate for each additional earlier application the same type of information as required in Box No. VI;
- (vii) if, in Box No. VI, the earlier application is an ARIPO application: in such case, write "Continuation of Box No. VI", specify the number of the item corresponding to that earlier application and indicate at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property for which that earlier application was filed.

2. If, with regard to the precautionary designation statement contained in Box No. V, the applicant wishes to exclude any State(s) from the scope of that statement: in such case, write "Designation(s) excluded from precautionary designation statement" and indicate the name or two-letter code of each State so excluded.

3. If the applicant claims, in respect of any designated Office, the benefits of provisions of the national law concerning non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty: in such case, write "Statement concerning non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty" and furnish that statement below.

Continuation of Box No. IV

von Kreisler, Alek
 Selting, Günther
 Werner, Hans-Karsten
 Fues, Johann F.
 Dallmeyer, Georg
 Hilleringmann, Jochen
 Jönsson, Hans-Peter
 Meyers, Hans-Wilhelm
 Weber, Thomas
 Helbing, Jörg

P.O. Box 10 22 41
 50462 Köln
 Germany

Box No. VI PRIORITY CLAIM			<input type="checkbox"/> Further priority claims are indicated in the Supplemental Box.		
Filing date of earlier application (day/month/year)	Number of earlier application	Where earlier application is:			
		national application: country	regional application: * regional Office	international application: receiving Office	
item (1) December 21, 1998	60/113,478	USA			
item (2) December 21, 1998	98 124 314.0	Europe			
item (3) December 21, 1998	198 60 549.8	Germany			
<input type="checkbox"/> The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) (only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of the present international application is the receiving Office) identified above as item(s): _____					
<small>* Where the earlier application is an ARIPO application, it is mandatory to indicate in the Supplemental Box at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property for which that earlier application was filed (Rule 4.10(b)(ii)). See Supplemental Box.</small>					
Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY					
Choice of International Searching Authority (ISA) <small>(if two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used):</small>		Request to use results of earlier search; reference to that search (if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority): Date (day/month/year) Number Country (or regional Office)			
ISA /					
Box No. VIII CHECK LIST; LANGUAGE OF FILING					
This international application contains the following number of sheets: request : 4 description (excluding sequence listing part) : 25 claims : 6 abstract : 1 drawings : 7 sequence listing part of description : _____ Total number of sheets : 43		This international application is accompanied by the item(s) marked below: 1. <input type="checkbox"/> fee calculation sheet 2. <input type="checkbox"/> separate signed power of attorney 3. <input type="checkbox"/> copy of general power of attorney; reference number, if any: 4. <input type="checkbox"/> statement explaining lack of signature 5. <input type="checkbox"/> priority document(s) identified in Box No. VI as item(s): 6. <input type="checkbox"/> translation of international application into (language): 7. <input type="checkbox"/> separate indications concerning deposited microorganism or other biological material 8. <input type="checkbox"/> nucleotide and/or amino acid sequence listing in computer readable form 9. <input type="checkbox"/> other (specify): _____			
Figure of the drawings which should accompany the abstract: 3		Language of filing of the international application: German			
Box No. IX SIGNATURE OF APPLICANT OR AGENT					
<small>Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).</small>					

For receiving Office use only	
1. Date of actual receipt of the purported international application: _____ 3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application: _____ 4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2): _____ 5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA /	2. Drawings: <input type="checkbox"/> received: <input type="checkbox"/> not received: 6. <input type="checkbox"/> Transmittal of search copy delayed until search fee is paid.

For International Bureau use only
Date of receipt of the record copy by the International Bureau: _____

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS**

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 992935woMegn	WEITERES VORGEHEN	siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 99/ 10142	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 21/12/1999	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 21/12/1998
Anmelder EVOTEC BIOSYSTEMS AG et al.		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 4 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.

☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

☐ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☒ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

POSITIONIERUNG DES MESSVOLUMENS IN EINEM SCANNING-MIKROSKOPISCHEN VERFAHREN

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

☐ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☒ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. 3

☒ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ keine der Abb.

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

Feld III

WORTLAUT DER ZUSAMMENFASSUNG (Fortsetzung von Punkt 5 auf Blatt 1)

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur optischen Erfassung mindestens einer Entität, die auf einem Substrat (60) angeordnet ist. Die mindestens eine Entität wird mit einem Messvolumen (70) unter Verwendung mindestens einer Strahlungsquelle (10) und einer konfokalen Optik (32) oder einer für die Mehrphotonenanregung ausgelegten Optik (32) gescannt. Sie behält für die Dauer der Aufnahme der Messwerte ihre Position hinsichtlich des Substrates (60) und/oder des Trägers (61) im wesentlichen bei. Vor und/oder während des Scanvorganges wird ein Hilfsfokus (71) unter Verwendung mindestens einer Strahlungsquelle (11) und einer Optik (34) erzeugt, der zumindest teilweise auf der Grenzfläche (62) zwischen Substrat (60) und angrenzender Komponente oder einer sonstigen in definierter räumlicher Beziehung zur Entität stehenden Grenzfläche (62) liegt. Ein Rückreflex aus dem Hilfsfokus (71) wird von mindestens einem Detektor (21) konfokal erfasst und zur Messung der Lage der Grenzfläche (62) und somit zur mittelbaren Positionierung des Messvolumens (70) genutzt. In dem erfindungsgemäßen Verfahren ist die Position des Hilfsfokus (71) relativ zum Messvolumen (70) definiert einstellbar.

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 7 G02B21/00

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RESEARCHIERTE GEBIETE

 Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
 IPK 7 G02B

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X ✓ A	US 5 248 876 A (KERSTENS PIETER J ET AL) 28. September 1993 (1993-09-28) Spalte 4, Zeile 27 - Spalte 5, Zeile 19; Abbildung 1	1, 2, 10, 17 16
X ✓	DE 197 13 362 A (ZEISS CARL JENA GMBH) 1. Oktober 1998 (1998-10-01) Spalte 4, Zeile 5 - letzte Zeile; Abbildungen 1, 3	1, 2, 16, 17

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

12. April 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

19/04/2000

 Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Ciarrocca, M

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X ✓	WO 95 22058 A (AFFYMAX TECH NV ; STERN DAVID (US); FIEKOWSKY PETER (US); TRULSON M) 17. August 1995 (1995-08-17) in der Anmeldung erwähnt	1,2,17
A ✓	Seite 1, Zeile 22 - Zeile 28 Seite 10, Zeile 34 -Seite 11, Zeile 6; Abbildung 1A Seite 16, Zeile 41 -Seite 18, Zeile 33 Anspruch 1	16
X ✓	US 5 062 715 A (NAKATA TOSHIHIKO ET AL) 5. November 1991 (1991-11-05) in der Anmeldung erwähnt	1,10,17
A ✓	Spalte 6, Zeile 51 -Spalte 8, Zeile 6; Abbildungen 1,7	16
A ✓	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 018, no. 436 (P-1786), 15. August 1994 (1994-08-15) & JP 06 137864 A (BROTHER IND LTD), 20. Mai 1994 (1994-05-20) in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung	1,7,16, 17
A ✓	US 5 084 612 A (IWASAKI OSAMU ET AL) 28. Januar 1992 (1992-01-28) in der Anmeldung erwähnt Spalte 9, Zeile 15 - Zeile 61; Abbildung 1	1,16,17
A ✓	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 098, no. 004, 31. März 1998 (1998-03-31) & JP 09 325277 A (NIKON CORP), 16. Dezember 1997 (1997-12-16) in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung	1,16,17
A ✓	US 4 844 617 A (KELDERMAN HERMAN F ET AL) 4. Juli 1989 (1989-07-04) Spalte 9, Zeile 34 - Zeile 61; Abbildung 9 Spalte 14, Zeile 18 - Zeile 34	1,2,7,9
A ✓	WO 92 15034 A (PHOENIX LASER SYSTEMS INC) 3. September 1992 (1992-09-03) das ganze Dokument	1,7,8,10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/10142

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5248876	A	28-09-1993	JP 2047965 C	25-04-1996
			JP 6094641 A	08-04-1994
			JP 7085060 B	13-09-1995
DE 19713362	A	01-10-1998	WO 9844375 A	08-10-1998
			EP 0904558 A	31-03-1999
WO 9522058	A	17-08-1995	US 5631734 A	20-05-1997
US 5062715	A	05-11-1991	JP 2243956 A	28-09-1990
			JP 2659429 B	30-09-1997
JP 06137864	A	20-05-1994	NONE	
US 5084612	A	28-01-1992	JP 3251811 A	11-11-1991
			JP 2608483 B	07-05-1997
			JP 3200915 A	02-09-1991
JP 09325277	A	16-12-1997	NONE	
US 4844617	A	04-07-1989	NONE	
WO 9215034	A	03-09-1992	US 5162641 A	10-11-1992
			AU 1444492 A	15-09-1992
			CA 2104380 A	20-08-1992
			CN 1067573 A	06-01-1993
			EP 0572527 A	08-12-1993
			JP 6505657 T	30-06-1994
			US 5286964 A	15-02-1994

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)



Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 992935wo Hi/go	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/10142	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 21/12/1999	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 21/12/1998
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK G02B21/00		
Anmelder EVOTEC BIOSYSTEMS AG et al.		

- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 7 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

 Diese Anlagen umfassen insgesamt 9 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 20/07/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 27.03.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Thieme, W Tel. Nr. +49 89 2399 2597 

I. Grundlag des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

Beschreibung, Seiten:

1-25 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-22 eingegangen am 27/01/2001 mit Schreiben vom 18/01/2001

Zeichnungen, Blätter:

1/7-7/7 ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/10142

- ☐ Beschreibung, Seiten:
☐ Ansprüche, Nr.:
☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1,3-21
	Nein: Ansprüche	2
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	1,3-21
	Nein: Ansprüche	
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-21
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:
siehe Beiblatt

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Die Entgegenhaltungen sind in der im Recherchenbericht angegebenen Reihenfolge bezeichnet:

D1 US, 5 248 876, A
D2 DE, 197 13 362, A
D3 WO, 95 22 058, A
D4 US, 5 062 715, A
D5 PATENT ABSTRACTS OF JAPAN zu JP, 06 137864, A
D6 US, 5 084 612, A
D7 PATENT ABSTRACTS OF JAPAN zu JP, 09 325277, A
D8 US, 4 844 617, A
D9 WO, 92 15034, A

2. Die Vorrichtung von Anspruch 15 scheint aus folgenden Gründen den Kriterien des Art.33 PCT zu genügen:
 - 2.1 Die Dokumente D1, D2, D4, D7 und D8 beschreiben neben anderen Vorrichtungen optische Geräte zur Abtastung von Objekten, wobei zwei Strahlenbündel auf das Objekt fokussiert werden (siehe beispielsweise D1, Figur 16). Sowohl ein erstes Strahlenbündel zur Messung als auch ein zweites Strahlenbündel zur Messung bzw. Autofokuseinstellung werden durch ein gemeinsames Objektiv auf das Objekt fokussiert.
 - 2.2 Von diesem Stand der Technik unterscheidet sich die beanspruchte Vorrichtung durch die Verwendung eines zweites Objektivs für das zweite Strahlenbündel.
 - 2.3 Die anderen verfügbaren Dokumente sind von geringerer Relevanz, weil deren optische Geräte das Objekt mit einem Strahl abtasten, der durch ein Objektiv auf das Objekt fokussiert wird.

- 2.3 Da keines der zitierten Dokumente die Verwendung eines zweiten Objektivs für ein zweites Strahlenbündel offenbart, folgt, dass die beanspruchte Vorrichtung durch den verfügbaren Stand der Technik auch nicht nahegelegt ist.
- 2.4 Die gleiche Betrachtung trifft auf den Verfahrensanspruch 1 zu, weil er korrespondierende Merkmale enthält.
3. Die Vorrichtung von Anspruch 17 scheint aus den gleichen Gründen wie Anspruch 15 gegenüber dem Stand der Technik neu und nicht-offensichtlich zu sein.
4. Die Vorrichtung von Anspruch 16 scheint aus folgenden Gründen den Kriterien des Art.33 PCT zu genügen:
- 4.1 Die Dokumente D1 und D2 beschreiben Vorrichtungen, die durch die Verwendung von Strahlquellen unterschiedlicher Farbe in Verbindung mit einer chromatischen Linse Höhenschnitte aufzeichnen. Die Strahlquellen und der Chromat legen den Abstand der Höhenschnitte fest (siehe D1, Figur 16; siehe D2, Figur 3).
- 4.2 Davon unterscheidet sich die Vorrichtung von Anspruch 16 unter anderem durch eine variable Einstellung des Abstands des Höhenschnitts zu einer Referenz.
- 4.3 Die weiteren zitierten Dokumente befassen sich nicht mit der Aufzeichnung von Höhenschnitten. Soweit Autofokussysteme in diesen Entgegenhaltungen beschrieben sind, scheint es das Ziel zu sein, das Messvolumen exakt in die Autofokusebene zu legen.
- 4.4 Da keines der Dokumente des verfügbaren Stands der Technik eine variable Einstellmöglichkeit zwischen den Lagen der Höhenschnitte offenbart oder vorschlägt, folgt daraus, dass die Vorrichtung von Anspruch 16 als nicht-offensichtlich gegenüber dem verfügbaren Stand der Technik angesehen werden kann.

- 4.5 Diese Betrachtung trifft in gleicher Weise auf die zweite Alternative des Verfahrensanspruchs 2 zu, welche im letzten Absatz genannt ist; vorausgesetzt, dass man den Term "einstellbar" als "variabel einstellbar" im Sinn des Vorrichtungsanspruchs interpretiert.
5. Die erste Alternative von Anspruch 2, welche im letzten Absatz definiert ist, genügt nicht den Kriterien des Art.33 PCT an die Neuheit.
- 5.1 Das Dokument D1 offenbart in Figur 16 und der zugehörigen Beschreibung ein Verfahren zur optischen Erfassung eines Objekts, wobei
- * ein Objekt 538 auf einem Träger 120 angeordnet ist;
 - * das Objekt unter Verwendung einer konfokalen Einrichtung mit einem Objektiv 532 gescannt wird (siehe Pfeil 54);
 - * das Objekt beispielsweise ein Halbleiterelement ist und somit für die Dauer der Messung ihre Position beibehält (siehe Spalte 3, Absatz 6);
 - * während des Scanvorgangs ein zweiter Fokus unter Verwendung des Objektivs erzeugt wird (siehe erster Fokus mit rot gefiltertem Licht und zweiter Fokus mit blau gefiltertem Licht), der in einer sonstigen Beziehung zu einer Grenzfläche des Objekts liegt (was auch immer die sonstige Beziehung ist);
 - * wobei das rote Licht von einer ersten Optik 554 und das blaue Licht von einer zweiten Optik 524 kollimiert wird;
 - * ein Rückreflex aus dem zweiten Fokus von einem Detektor mit einer konfokal angeordneten Blende erfasst wird (siehe Element 540) und zur Messung der Lage einer Grenzfläche wie beispielsweise der Oberfläche des Halbleiterelements genutzt wird (siehe die Figur); und wobei
 - * die Position des zweiten Fokus relativ zum Meßvolumen eingestellt ist (bedingt durch die Wahl der Farbfilter).

Alternativ zu einer Lichtquelle mit Farbfiltern ist in Dokument D1 die Verwendung von mehreren monochromatischen Lichtquellen offenbart (siehe Spalte 14, Zeilen 46 bis 50).

Somit ist die erste Alternative von Anspruch 2 nicht neu, weil sich für jedes Merkmal ein Gegenstück im Dokument D1 findet.

Zu Punkt VIII

Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

1. Die Anmeldung enthält einige Unklarheiten und genügt deshalb nicht Art.6 PCT.
 - 1.1 Das Ausführungsbeispiel der Figur 1 scheint nicht mehr von Ansprüchen abgedeckt zu sein. Diese Inkonsistenz führt zu Unklarheit über die beanspruchten Gegenstände.
 - 1.2 Die variable Einstellung des Abstands des Höhenschnitts zu einer Referenz, die vom Hilfsfokus abgetastet wird, wird durch den Ausdruck "einstellbar" in den unabhängigen Verfahrensansprüchen nur unzureichend definiert. Es wäre zutreffender in Anlehnung zu den Vorrichtungsansprüchen einen Ausdruck wie "variabel einstellbar" zu verwenden.
 - 1.3 Die Bezugnahme in den unabhängigen Verfahrensansprüchen auf eine an das Substrat angrenzende Komponente ohne weitere Definition läßt im Unklaren, welche Fläche als Referenz verwendet wird.

Es ist nicht erkennbar, welche Grenzfläche durch die Bezugnahme auf "eine sonstige in definierter räumlicher Beziehung ... stehenden Grenzfläche" gemeint sein könnte.

Hi-bu 992935wo

18. Januar 2001

Ansprüche

1. Verfahren zur optischen Erfassung mindestens einer Entität, bei der es sich um Moleküle, Molekülkomplexe, Polymere, polymere Partikel, aus anorganischen Materialien aufgebaute Partikel, vesikuläre Strukturen, Zellen, Bakterien oder Viren handelt, wobei
 - die mindestens eine Entität auf und/oder in einem, bevorzugt auf einem Träger (61) befindlichen, Substrat (60) angeordnet ist, dessen Brechungsindex verschieden ist von mindestens einer an das Substrat (60) angrenzenden Komponente,
 - die mindestens eine Entität mit einem Messvolumen (70) unter Verwendung mindestens einer konfokalen oder für die Mehrphotonenanregung ausgelegten Einrichtung, bestehend aus einer ersten Strahlungsquelle (10) und mindestens einem ersten Objektiv (32), unter Erhalt von Messwerten optischer Parameter gescannt wird und die Messwerte zur Charakterisierung der mindestens einen Entität mittels Signalverarbeitung bearbeitet werden,
 - die mindestens eine Entität für die Dauer der Aufnahme der Messwerte ihre Position hinsichtlich des Substrates (60) und/oder des Trägers (61) im wesentlichen beibehält,
 - vor und/oder während des Scanvorganges ein Hilfsfokus (71) unter Verwendung mindestens einer zweiten Strahlungsquelle (11) und eines zweiten Objektivs (34) erzeugt wird, der zumindest teilweise auf der Grenzfläche (62) zwischen Substrat (60) und angrenzender Komponente oder einer sonstigen in definierter räumlicher Beziehung zur Entität stehenden Grenzfläche (62) liegt,
 - die von der ersten Strahlungsquelle (10) erzeugte Strahlung durch eine erste Optik (33) kollimiert wird und die von der zweiten Strah-

- 2 -

lungsquelle (11) erzeugte Strahlung durch eine hiervon verschiedene zweite Optik (31) kollimiert wird,

- ein Rückreflex aus dem Hilfsfokus (71) von einem Detektor (21) mit einer konfokal angeordneter Blende (51) oder von mehreren Detektoren (21,22) mit entlang der optischen Achse des den Hilfsfokus (71) erzeugenden Objektivs (34) vor und/oder hinter der Bildebene angeordneten Blenden (51,52) erfasst wird und zur Messung der Lage der Grenzfläche (62) und somit zur mittelbaren Positionierung des Messvolumens (70) genutzt wird, und
- die Position des Hilfsfokus (71) relativ zum Messvolumen (70) definiert eingestellt ist oder einstellbar ist.

2. Verfahren zur optischen Erfassung mindestens einer Entität, bei der es sich um Moleküle, Molekülkomplexe, Polymere, polymere Partikel, aus anorganischen Materialien aufgebaute Partikel, vesikuläre Strukturen, Zellen, Bakterien oder Viren handelt, wobei

- die mindestens eine Entität auf und/oder in einem, bevorzugt auf einem Träger (61) befindlichen, Substrat (60) angeordnet ist, dessen Brechungsindex verschieden ist von mindestens einer an das Substrat (60) angrenzenden Komponente,
- die mindestens eine Entität mit einem Messvolumen (70) unter Verwendung mindestens einer konfokalen oder für die Mehrphotonenanregung ausgelegten Einrichtung, bestehend aus einer ersten Strahlungsquelle (10) und mindestens einem Objektiv (32), unter Erhalt von Messwerten optischer Parameter gescannt wird und die Messwerte zur Charakterisierung der mindestens einen Entität mittels Signalverarbeitung bearbeitet werden,
- die mindestens eine Entität für die Dauer der Aufnahme der Messwerte ihre Position hinsichtlich des Substrates (60) und/oder des Trägers (61) im wesentlichen beibehält,
- vor und/oder während des Scanvorganges ein Hilfsfokus (71) unter Verwendung mindestens einer zweiten Strahlungsquelle (11) und des

- 3 -

Objektivs (32) erzeugt wird, der zumindest teilweise auf der Grenzfläche (62) zwischen Substrat (60) und angrenzender Komponente oder einer sonstigen in definierter räumlicher Beziehung zur Entität stehenden Grenzfläche (62) liegt,

- die von der ersten Strahlungsquelle (10) erzeugte Strahlung durch eine erste Optik (33) kollimiert wird und die von der zweiten Strahlungsquelle (11) erzeugte Strahlung durch eine hiervon verschiedene zweite Optik (31) kollimiert wird,
 - ein Rückreflex aus dem Hilfsfokus (71) von einem Detektor (21) mit einer konfokal angeordneten Blende (51) oder von mehreren Detektoren (21,22) mit entlang der optischen Achse des den Hilfsfokus (71) erzeugenden Objektivs (32) vor und/oder hinter der Bildebene angeordneten Blenden (51,52) erfasst wird und zur Messung der Lage der Grenzfläche (62) und somit zur mittelbaren Positionierung des Messvolumens (70) genutzt wird, und
 - die Position des Hilfsfokus (71) relativ zum Messvolumen (70) definiert eingestellt ist oder einstellbar ist.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und/oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Ausdehnung des konfokal detektierten Volumens des Hilfsfokus (71) insbesondere in Richtung der jeweiligen optischen Achsen der Objektive (32, 34) geringer ist als die Ausdehnung des Messvolumens (70).
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass zwecks Erzielung der geringeren Ausdehnung des konfokal detektierten Volumens des Hilfsfokus (71) dieser mittels eines zweiten Objektivs (34) mit einer Numerischen Apertur erzeugt wird, die größer ist als die Numerische Apertur des zur Erzeugung des Messvolumens (70) verwendeten ersten Objektivs (32):
5. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass zwecks Erzielung der geringeren Ausdehnung des konfokal detektierten Volumens des

- 4 -

Hilfsfokus (71) zur Erzeugung des Messvolumens (70) ein geringerer Teil der Numerischen Apertur eines gemeinsamen oder der jeweiligen Objektive (32, 34) genutzt wird als zur Erzeugung des Hilfsfokus (71).

6. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass zwecks Erzielung der geringeren Ausdehnung des konfokal detektierten Volumens des Hilfsfokus (71) eine konfokal angeordnete Blende (51) bei der Detektion des Hilfsfokus (71) verwendet wird, die eine geringere Öffnung aufweist als eine bei der Detektion des Messvolumens (70) verwendete, konfokal angeordnete Blende (50).
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass zur mittelbaren Positionierung des Messvolumens (70) die Position des Hilfsfokus (71) relativ zur Grenzfläche (62) im wesentlichen entlang der optischen Achse des den Hilfsfokus (71) erzeugenden Objektivs (34) bevorzugt periodisch bewegt wird, die Intensität des Rückreflexes in Abhängigkeit von der Bewegung von dem Detektor (21) registriert wird und die Lage des Hilfsfokus (71) derart nachgeregelt wird, dass die Intensität des Rückreflexes ihr Maximum erreicht.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass zur mittelbaren Positionierung des Messvolumens (70) die Position des Hilfsfokus (71) relativ zur Grenzfläche (62) sowohl lateral zur optischen Achse des den Hilfsfokus (71) erzeugenden Objektivs (34) als auch axial bewegt wird.
9. Verfahren nach Anspruch 7 und/oder 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Amplitude der bevorzugt periodischen Bewegung des Hilfsfokus (71) kleiner als oder gleich der axialen Ausdehnung des Messvolumens (70) ist.

- 5 -

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Intensität des Rückreflexes mittels mindestens zweier Detektoren (21,22) erfasst wird und die Lage der Grenzfläche (62) aus der Verteilung der von den Detektoren (21,22) erfassten Intensitäten bestimmt wird.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass als optische Parameter die Streulichtintensität und/oder die Streulichtintensität in Abhängigkeit von der Polarisierung und/oder die Fluoreszenzintensität bei mindestens einer Wellenlänge und/oder die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Polarisierung und/oder die Fluoreszenzlebensdauer und/oder molekulare Helligkeiten und/oder Raman-Streuung und/oder Lumineszenz aufgenommen werden.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass mineralische oder organische Substrate (60), insbesondere polymere Gele, polymere Partikel, aus anorganischen Materialien aufgebaute Partikel, vesikuläre Strukturen, Zellen, Bakterien und Viren eingesetzt werden.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass anhand der optischen Parameter ausgewählte Entitäten und/oder Substrate (60) während oder im Anschluss an den Scanvorgang von den übrigen Entitäten und/oder Substraten (60) getrennt werden.
14. Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 13 für die Wirkstoffsuche, die funktionale Analyse kombinatorisch-chemischer oder kombinatorisch-biologischer Syntheseprodukte, die funktionale Genomanalyse, die evolutive Biotechnologie, die Diagnostik, die Proteomanalyse oder die Materialuntersuchung.

- 6 -

15. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1 zur optischen Erfassung mindestens einer Entität, bei der es sich um Moleküle, Molekülkomplexe, Polymere, polymere Partikel, aus anorganischen Materialien aufgebaute Partikel, vesikuläre Strukturen, Zellen, Bakterien oder Viren handelt, mit

- mindestens einer ersten Strahlungsquelle (10) sowie mindestens einer konfokalen oder für die Mehrphotonenanregung ausgelegten Einrichtung bestehend aus einem ersten Objektiv (32) und mindestens einem ersten Detektor (20) zur Aufnahme von Messwerten aus einem Messvolumen (70),
- mindestens einer zweiten Strahlungsquelle (11) sowie mindestens einer weiteren Einrichtung bestehend aus einem zweiten Objektiv (34) und einem zur Aufnahme eines Rückreflexes aus einem Hilfsfokus (71) vorgesehenen zweiten Detektor (21) mit einer konfokal angeordneten Blende (51) oder mehreren zur Aufnahme eines Rückreflexes aus einem Hilfsfokus (71) vorgesehenen zweiten Detektoren (21,22) mit entlang der optischen Achse des den Hilfsfokus (71) erzeugenden zweiten Objektivs (34) vor und/oder hinter der Bildebene angeordneten Blenden (51,52),
- mindestens einer Einrichtung zur Positionierung von Messvolumen (70) und Hilfsfokus (71) relativ zu einem Substrat (60),
- einer Einrichtung zur variablen Positionierung des Hilfsfokus (71) relativ zum Messvolumen (70),
- einer ersten Optik (33), die die von der ersten Strahlungsquelle (10) erzeugte Strahlung kollimiert, und
- einer hiervon verschiedenen zweiten Optik (31), die die von der zweiten Strahlungsquelle (11) erzeugte Strahlung kollimiert.

16. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1 zur optischen Erfassung mindestens einer Entität, bei der es sich um Moleküle, Molekülkomplexe, Polymere, polymere Partikel, aus anorganischen Mate-

- 7 -

rialien aufgebaute Partikel, vesikuläre Strukturen, Zellen, Bakterien oder Viren handelt, mit

- mindestens einer ersten Strahlungsquelle (10) sowie mindestens einer konfokalen oder für die Mehrphotonenanregung ausgelegten Einrichtung bestehend aus einem Objektiv (32) und mindestens einem ersten Detektor (20) zur Aufnahme von Messwerten aus einem Messvolumen (70),
- mindestens einer zweiten Strahlungsquelle (11) sowie mindestens einer weiteren Einrichtung bestehend aus demselben Objektiv (32) und einem zur Aufnahme eines Rückreflexes aus einem Hilfsfokus (71) vorgesehenen zweiten Detektor (21) mit einer konfokal angeordneten Blende (51) oder mehreren zur Aufnahme eines Rückreflexes aus einem Hilfsfokus (71) vorgesehenen zweiten Detektoren (21,22) mit entlang der optischen Achse des den Hilfsfokus (71) erzeugenden Objektivs (32) vor und/oder hinter der Bildebene angeordneten Blenden (51,52),
- mindestens einer Einrichtung zur Positionierung von Messvolumen (70) und Hilfsfokus (71) relativ zu einem Substrat (60),
- einer Einrichtung zur variablen Positionierung des Hilfsfokus (71) relativ zum Messvolumen (70),
- einer ersten Optik (33), die die von der ersten Strahlungsquelle (10) erzeugte Strahlung kollimiert, und
- einer hiervon verschiedenen zweiten Optik (31), die die von der zweiten Strahlungsquelle (11) erzeugte Strahlung kollimiert.

17. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1 zur optischen Erfassung mindestens einer Entität, bei der es sich um Moleküle, Molekülkomplexe, Polymere, polymere Partikel, aus anorganischen Materialien aufgebaute Partikel, vesikuläre Strukturen, Zellen, Bakterien oder Viren handelt, mit

- mindestens einer ersten Strahlungsquelle (10) sowie mindestens einer konfokalen oder für die Mehrphotonenanregung ausgelegten

- 8 -

Einrichtung bestehend aus einem ersten Objektiv (32) und mindestens einem ersten Detektor (20) zur Aufnahme von Messwerten aus einem Messvolumen (70),

- mindestens einer zweiten Strahlungsquelle (11) sowie mindestens einer weiteren Einrichtung bestehend aus einem zweiten Objektiv (34) und einem zur Aufnahme eines Rückreflexes aus einem Hilfsfokus (71) vorgesehenen zweiten Detektor (21) mit einer konfokal angeordneten Blende (51) oder mehreren zur Aufnahme eines Rückreflexes aus einem Hilfsfokus (71) vorgesehenen zweiten Detektoren (21,22) mit entlang der optischen Achse des den Hilfsfokus (71) erzeugenden zweiten Objektivs (34) vor und/oder hinter der Bildebene angeordneten Blenden (51,52),
- mindestens einer Einrichtung zur Positionierung von Messvolumen (70) und Hilfsfokus (71) relativ zu einem Substrat (60),
- wobei der Hilfsfokus (71) relativ zum Messvolumen (70) definiert eingestellt ist,
- einer ersten Optik (33), die die von der ersten Strahlungsquelle (10) erzeugte Strahlung kollimiert, und
- einer hiervon verschiedenen zweiten Optik (31), die die von der zweiten Strahlungsquelle (11) erzeugte Strahlung kollimiert.

18. Vorrichtung nach Ansprüchen 15 und/oder 16, dadurch gekennzeichnet, dass die Einrichtung zur Positionierung von Messvolumen (70) und Hilfsfokus (71) relativ zu einem Substrat (60) Mittel zur Positionierung des Hilfsfokus (71) relativ zum Messvolumen (70) umfasst.

19. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 15 oder 18, dadurch gekennzeichnet, dass die Einrichtung zur Positionierung des Hilfsfokus (71) relativ zum Messvolumen (70) Mittel zur Einstellung der relativen Position der Objektive (32, 34) zueinander umfasst.

- 9 -

20. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 15, 16, 18 oder 19, dadurch gekennzeichnet, dass die Einrichtung zur Positionierung des Hilfsfokus (71) relativ zum Messvolumen (70) Mittel zur Variation der Konvergenz derjenigen Strahlenbündel umfasst, welche zur Erzeugung des Hilfsfokus (71) und des Messvolumens (70) von dem jeweiligen Objektiv (32,34) fokussiert werden.
21. Verwendung der Vorrichtung nach einem der Ansprüche 15 bis 20 in der Wirkstoffsuche, der funktionalen Analyse kombinatorisch-chemischer oder kombinatorisch-biologischer Syntheseprodukte, der funktionalen Genomanalyse, der evolutiven Biotechnologie, der Diagnostik, der Proteom-Analyse oder der Materialuntersuchung.

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS**

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 992935woMegn	WEITERES VORGEHEN	siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 99/ 10142	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 21/12/1999	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 21/12/1998
Anmelder EVOTEC BIOSYSTEMS AG et al.		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 4 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.

☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

☐ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☒ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

POSITIONIERUNG DES MESSVOLUMENS IN EINEM SCANNING-MIKROSKOPISCHEN VERFAHREN

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

☐ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☒ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. 3

☒ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ keine der Abb.

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

Feld III

WORTLAUT DER ZUSAMMENFASSUNG (Fortsetzung von Punkt 5 auf Blatt 1)

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur optischen Erfassung mindestens einer Entität, die auf einem Substrat (60) angeordnet ist. Die mindestens eine Entität wird mit einem Messvolumen (70) unter Verwendung mindestens einer Strahlungsquelle (10) und einer konfokalen Optik (32) oder einer für die Mehrphotonenanregung ausgelegten Optik (32) gescannt. Sie behält für die Dauer der Aufnahme der Messwerte ihre Position hinsichtlich des Substrates (60) und/oder des Trägers (61) im wesentlichen bei. Vor und/oder während des Scanvorganges wird ein Hilfsfokus (71) unter Verwendung mindestens einer Strahlungsquelle (11) und einer Optik (34) erzeugt, der zumindest teilweise auf der Grenzfläche (62) zwischen Substrat (60) und angrenzender Komponente oder einer sonstigen in definierter räumlicher Beziehung zur Entität stehenden Grenzfläche (62) liegt. Ein Rückreflex aus dem Hilfsfokus (71) wird von mindestens einem Detektor (21) konfokal erfasst und zur Messung der Lage der Grenzfläche (62) und somit zur mittelbaren Positionierung des Messvolumens (70) genutzt. In dem erfindungsgemäßen Verfahren ist die Position des Hilfsfokus (71) relativ zum Messvolumen (70) definiert einstellbar.

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 7 G02B21/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RESEARCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
 IPK 7 G02B

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^o	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X A	US 5 248 876 A (KERSTENS PIETER J ET AL) 28. September 1993 (1993-09-28) Spalte 4, Zeile 27 - Spalte 5, Zeile 19; Abbildung 1 ---	1, 2, 10, 17 16
X	DE 197 13 362 A (ZEISS CARL JENA GMBH) 1. Oktober 1998 (1998-10-01) Spalte 4, Zeile 5 - letzte Zeile; Abbildungen 1, 3 --- -/-	1, 2, 16, 17

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

^o Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

12. April 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

19/04/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Ciarrocca, M

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 95 22058 A (AFFYMAX TECH NV ; STERN DAVID (US); FIEKOWSKY PETER (US); TRULSON M) 17. August 1995 (1995-08-17) in der Anmeldung erwähnt	1,2,17
A	Seite 1, Zeile 22 - Zeile 28 Seite 10, Zeile 34 -Seite 11, Zeile 6; Abbildung 1A Seite 16, Zeile 41 -Seite 18, Zeile 33 Anspruch 1	16
X	US 5 062 715 A (NAKATA TOSHIHIKO ET AL) 5. November 1991 (1991-11-05) in der Anmeldung erwähnt	1,10,17
A	Spalte 6, Zeile 51 -Spalte 8, Zeile 6; Abbildungen 1,7	16
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 018, no. 436 (P-1786), 15. August 1994 (1994-08-15) & JP 06 137864 A (BROTHER IND LTD), 20. Mai 1994 (1994-05-20) in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung	1,7,16, 17
A	US 5 084 612 A (IWASAKI OSAMU ET AL) 28. Januar 1992 (1992-01-28) in der Anmeldung erwähnt Spalte 9, Zeile 15 - Zeile 61; Abbildung 1	1,16,17
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 098, no. 004, 31. März 1998 (1998-03-31) & JP 09 325277 A (NIKON CORP), 16. Dezember 1997 (1997-12-16) in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung	1,16,17
A	US 4 844 617 A (KELDERMAN HERMAN F ET AL) 4. Juli 1989 (1989-07-04) Spalte 9, Zeile 34 - Zeile 61; Abbildung 9 Spalte 14, Zeile 18 - Zeile 34	1,2,7,9
A	WO 92 15034 A (PHOENIX LASER SYSTEMS INC) 3. September 1992 (1992-09-03) das ganze Dokument	1,7,8,10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/10142

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5248876	A	28-09-1993	JP 2047965 C	25-04-1996
			JP 6094641 A	08-04-1994
			JP 7085060 B	13-09-1995
DE 19713362	A	01-10-1998	WO 9844375 A	08-10-1998
			EP 0904558 A	31-03-1999
WO 9522058	A	17-08-1995	US 5631734 A	20-05-1997
US 5062715	A	05-11-1991	JP 2243956 A	28-09-1990
			JP 2659429 B	30-09-1997
JP 06137864	A	20-05-1994	NONE	
US 5084612	A	28-01-1992	JP 3251811 A	11-11-1991
			JP 2608483 B	07-05-1997
			JP 3200915 A	02-09-1991
JP 09325277	A	16-12-1997	NONE	
US 4844617	A	04-07-1989	NONE	
WO 9215034	A	03-09-1992	US 5162641 A	10-11-1992
			AU 1444492 A	15-09-1992
			CA 2104380 A	20-08-1992
			CN 1067573 A	06-01-1993
			EP 0572527 A	08-12-1993
			JP 6505657 T	30-06-1994
			US 5286964 A	15-02-1994